

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Der Effekt von immunstimulatorischer DNA und Adenosin
auf die Migration und Funktion humaner plasmazytoider
dendritischer Zellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Söllner

aus Bamberg

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Haas
PD Dr. R. Blum

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. G. Hartmann
PD Dr. med. S. Rothenfuß

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2009

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
1	Die Immunologie: von den Anfängen bis zur Gegenwart	1
2	Das humane Immunsystem	3
2.1	Angeborene und adaptive Immunität	3
2.2	Pathogen-assoziierte molekulare Muster und ihre Rezeptoren	5
2.2.1	Toll-like Rezeptoren (TLRs)	6
2.2.2	Die humanen TLRs und ihre Liganden	8
2.3	Endogene Gefahrensignale und ihre Rezeptoren	9
2.3.1	Purinrezeptoren und Nukleotid-vermittelte Zellaktivierung	10
2.3.2	Vorkommen und Funktion von Adenosin	11
2.3.3	Der Adenosinrezeptor mit seinen Subtypen	11
3	Chemokine als Koordinatoren des Immunsystems	12
3.1	Klassifikation und Struktur von Chemokinen und ihren Rezeptoren	12
3.2	Funktion von Chemokinen und Signalvermittlung	14
4	Die dendritische Zelle (DC)	17
4.1	Die Familie der dendritischen Zellen	17
4.2	Subpopulationen dendritischer Zellen	17
4.3	Die Entdeckung der plasmazytoiden dendritischen Zelle (PDC)	18
4.4	Funktionelle Charakteristika der PDC	19
4.4.1	Interferonproduktion	19
4.4.2	Vermittlung einer T-Zell-regulierten Immunantwort	20
4.5	Lokalisation und Zirkulation der PDC	22
4.6	Rezeptorexpression auf DCs	23
4.6.1	Chemokinrezeptoren und ihre Liganden auf PDCs	23
4.6.2	Toll-like Rezeptoren auf DCs	24
4.6.3	Adenosinrezeptoren auf DCs	24
4.7	Klinische Bedeutung der PDC	26
5	CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN)	27
5.1	CpG-DNA als Pathogen-assoziierte molekulare Muster	27
5.2	Einteilung der CpG-Oligonukleotide	28
5.3	Wirkung von CpG-ODN auf das Immunsystem	30
5.4	Molekulare Wirkmechanismen	31
5.5	Therapeutische Anwendung von CpG-ODN	32
6	Fragestellung	33

B	Material und Methoden	35
1	Reagenzien, Chemikalien und Geräte	35
1.1	Geräte	35
1.2	Chemikalien	35
1.3	Materialien für die Zellkultur	36
1.4	Zellkulturmedien und Puffer	36
1.5	Reagenziensätze	37
1.6	Zytokine, Chemokine und Wachstumsstimulatoren	37
1.7	FACS-Antikörper	38
1.8	Oligodesoxynukleotide	39
2	Zellisolation und Kultur	39
2.1	Aufreinigung von peripheren mononukleären Zellen	39
2.2	Magnetische Zellsortierung zur PDC-Gewinnung	40
2.3	Kultur plasmazytoider dendritischer Zellen	41
2.4	Generierung von Th1- und Th2-Zellen	41
2.5	Bestrahlung von Stimulatorzellen	42
3	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	42
4	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	43
4.1	Allgemeines Funktionsprinzip	43
4.2	Bestimmung von Oberflächenmolekülen	45
4.3	Zellzahlbestimmung mit dem Durchflusszytometer	46
4.4	Darstellung intrazellulärer Chemokine in PDCs	46
5	Chemotaxis-Assay	47
6	Intrazelluläre Kalziummessung	49
7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
7.1	RNA-Isolation und Reverse Transkription	50
7.2	Allgemeines Funktionsprinzip	51
8	Statistische Analyse	52
C	Ergebnisse	53
Teil I: Chemokinexpression, Chemotaxis und chemotaktische Interaktion		
plasmazytoider dendritischer Zellen mit anderen Zellen		53
1	Chemokinexpression und Chemotaxis von PDCs nach Aktivierung durch CpG-ODN	53
1.1	Gesteigerte Expression von Chemokinen in stimulierten PDCs	53
1.2	Kalziumflux in PDCs nach SDF-1-Gabe und Migration zu SDF-1	55
1.3	Synergistische Wirkung von Chemokinkombinationen auf die Migration	58

2	Migration von PDCs zur eigenen Zellpopulation	60
3	Migration von T-Zellen zu PDCs.....	65
Teil II: Die Wirkung von Adenosin auf plasmazytoide dendritische Zellen		68
4	Der modulierende Effekt von Adenosin auf PDCs	68
4.1	Expression von Adenosinrezeptoren auf PDCs.....	68
4.2	Chemotaxis von PDCs zu Adenosin	69
4.3	Inhibition der Zytokinproduktion in reifen PDCs durch Adenosin	70
D	Diskussion	72
1	Übersicht über die experimentellen Befunde	72
2	Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur	74
2.1	Die plasmazytoide dendritische Zelle als Chemokin-sensible Zelle.....	74
2.1.1	Stellt SDF-1 den einzigen chemotaktischen Stimulus dar?.....	75
2.1.2	Synergismus zwischen SDF-1 und CXCR3- oder CCR5-Liganden	76
2.1.3	Chemerin als Stimulus für unreife PDCs	77
2.1.4	Adenosin-vermittelte PDC-Migration	78
2.1.5	Welche Chemokine produziert die stimulierte PDC?	79
2.2	CpG-aktivierte PDCs als neuer Stimulus für PDCs	80
2.3	Unterschied von CpG-A und -B durch Interferon- <i>Priming</i> der PDC	82
2.4	Die Interaktion zwischen stimulierten PDCs und T-Helfer-Zellen	83
2.5	Adenosin als Modulator der PDC-Antwort.....	86
2.5.1	Adenosinrezeptor-Expression auf PDCs entsprechend ihres Reifegrades.....	86
2.5.2	A ₁ -Rezeptor-gesteuerte Migration unreifer PDCs zu Adenosin.....	87
2.5.3	Die PDC als IL-12-Produzent?	87
2.5.4	A _{2a} -Rezeptor-vermittelte Modulation der Zytokinproduktion in PDCs....	89
3	Klinische Relevanz der Ergebnisse	91
E	Zusammenfassung	96
F	Literaturverzeichnis	99
G	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	114
H	Danksagung	117
I	Veröffentlichung	118
J	Lebenslauf	119

A Einleitung

1 Die Immunologie: von den Anfängen bis zur Gegenwart



Abb. 1: Der Pesthof stellt die Verhältnisse in einem Hamburger Hospital im Jahr 1746 dar. Inmitten regen ärztlichen Treibens wird einem Patienten ein Bein amputiert. (aus „Die Geschichte der Medizin im Spiegel der Kunst“ von A. S. Lyons und R. J. Petrucelli II)

Die ältesten immunologischen Beobachtungen stammen bereits aus dem Jahr 430 vor Christus. Zur Zeit des Peloponnesischen Krieges beobachtete der Geschichtsschreiber Thucydides während einer Seuche in Athen, dass nur diejenigen Menschen, die bereits selbst die Krankheit durchgestanden und überlebt hatten, Erkrankte versorgen konnten, ohne sich selbst erneut zu infizieren.

Erst zwei Jahrtausende später stellte der Landarzt Edward Jenner 1796 in einem Experiment (abgeleitet vom lateinischen *experiri*: versuchen, prüfen, erfahren) an einem achtjährigen gesunden Jungen folgendes fest: wenn man einen Menschen mit Kuhpocken impfte, war er vor der gefährlichen Infektion mit Menschenpocken geschützt. Melkerinnen, die sich mit den für Menschen harmlos verlaufenden Kuhpocken infiziert hatten, blieben von den damals häufig auftretenden Pockenepidemien verschont oder zeigten nur leichte Krankheitsverläufe. Jenner bezeichnete sein Verfahren als *vaccination* (Vakzination, abgeleitet vom lateinischen *vacca*: die Kuh). Dieser Begriff steht auch heute noch für die Schutzimpfung einer

gesunden Person mit abgeschwächten oder attenuierten Krankheitserregern. Aufgrund seiner Entdeckung gilt Edward Jenner als Begründer der Immunologie. Bis die anfangs umstrittenen Massenschutzimpfungen überall auf der Welt eingeführt waren, verging geraume Zeit. 1979 verkündete die Weltgesundheitsorganisation (WHO), dass die Pocken ausgerottet seien - ein Meilenstein in der modernen Medizin.

Zur Zeit von Jenners erster Schutzimpfung waren die Kenntnisse über die Vielzahl der Krankheitserreger noch ungenau. Erst im 19. Jahrhundert erbrachte Robert Koch den Beweis, dass Infektionskrankheiten auf Mikroorganismen zurückzuführen sind. Diese können einen spezifischen Krankheitsverlauf verursachen. Heute sind vier große Gruppen mikrobieller Pathogene bekannt: Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten. Neben dem Erreger der Tuberkulose entdeckte Koch auch die Tuberkulin-Reaktion, die auf Basis der Immunantwort den Nachweis einer Tuberkulose-Infektion ermöglichte.

Ebenfalls noch im 19. Jahrhundert entwickelte Louis Pasteur, aufbauend auf den Erkenntnissen seiner Vorgänger, Impfsenen gegen Cholera und Tollwut. Von den über 300 gegen Tollwut geimpften und im Verlauf infizierten Personen, verstarb kein einziger. Die Postexpositionsprophylaxe ist noch heute ein wichtiger Bestandteil in der Therapie akuter Infektionen wie Tetanus, Diphtherie oder HIV.

Schließlich gelang es dem New Yorker Chirurgen William B. Coley im Jahr 1893 mit einer Kombination von Bakterienextrakten Tumorpatienten erfolgreich zu behandeln (Coley 1991, *classic collection*). Erst 100 Jahre später beginnen wir die Mechanismen der antitumoralen Wirkung dieser bakteriellen Lysate zu verstehen: durch Imitation einer bakteriellen Infektion kann eine spezifische antitumorale Immunantwort im Sinne einer endogenen Vakzinierung verstärkt werden. Die Suche nach den zugrunde liegenden Wirkmechanismen und damit der Zugang zu einer gezielt therapeutischen Manipulation ist weiterhin eine wesentliche Triebkraft der immunologischen Wissenschaft.

Mit dem heutigen molekularen Wissen bezüglich des Immunsystems ist es möglich, verschiedenste Krankheiten, angefangen von Tumoren über Infektionen bis hin zu Autoimmunerkrankungen zu beeinflussen.

Eine zentrale Rolle spielen dabei dendritische Zellen (DCs), die als Antigen-präsentierende Zellen (APCs) eine Mittlerfunktion zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem einnehmen. Die Aktivierung dendritischer Zellen wird über sogenannte Gefahrensignale (*danger signals*) ausgelöst. Dies kann entweder durch exogene mikrobielle Strukturen wie z. B. bestimmte mikrobielle DNA-Sequenzen, die CpG-Motive (CpG-DNA) enthalten, oder durch endogene Moleküle wie beispielsweise

Adenosin geschehen und so zur Initiierung einer Immunantwort führen. Die DCs sind dabei entscheidend an der Integration der verschiedenen Gefahrensignale beteiligt.

Ein fein abgestimmtes System von Chemokinen wiederum sorgt dabei dafür, dass die DCs am Ort der Gefahr präsent sind, um dort die Information via *danger signals* aufzunehmen und dann, je nach erforderlicher Immunantwort, in Interaktion mit weiteren Zellen zu treten, die als Effektorzellen gezielte Abwehrmechanismen bereit stellen. Die vorliegende Arbeit untersucht die plasmazytoide dendritische Zelle (PDC) und charakterisiert den Einfluss endogener und exogener Gefahrensignale auf ihr migratorisches und funktionelles Verhalten im Zusammenspiel mit anderen Immunzellen. Damit trägt die Arbeit bei zum Verständnis der PDCs, einer Untergruppe dendritischer Zellen, denen eine zentrale Rolle in der Abwehr viraler Infektionen zugeschrieben wird.

2 Das humane Immunsystem

2.1 Angeborene und adaptive Immunität

Tagtäglich sieht sich jeder Mensch mit einer Vielzahl von bedrohlichen Mikroorganismen und durch diese hervorgerufene Infektionen konfrontiert. Die Hauptaufgabe des Immunsystems (abgeleitet vom lateinischen *immunis*: frei, verschont, unberührt) besteht darin, ein komplexes Abwehrsystem gegen eindringende Pathogene bereitzustellen. Eine faszinierende Eigenschaft ist dabei die Unterscheidung von "Selbst" und "Fremd", worunter auch pathologisch transformierte eigene Zellen, wie Tumorzellen und Virus-infizierte Zellen, verstanden werden.

In der Immunologie hat sich die Einteilung in zwei Komponenten etabliert: Einerseits das angeborene, evolutionsgeschichtlich alte Immunsystem, das eine unspezifische, im Sinne von vielen Mikroorganismen gemeinsame Abwehr leistet; andererseits das erworbene (= adaptive) Immunsystem, das individuell spezifische Mechanismen zur Verfügung stellt.

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie des menschlichen Organismus dar und kann zur Erkennung von Mikroorganismen nur eine begrenzte Anzahl von genetisch determinierten Rezeptoren einsetzen, die hochkonservierte Strukturen erkennen. Vermutlich werden etwa 90 Prozent aller Infektionen durch das angeborene Immunsystem erkannt und erfolgreich bekämpft. Bei Konfrontation mit einem Pathogen stehen sofort zahlreiche Mechanismen zur Verfügung. Dazu zählen

Haut- und Schleimhautbarrieren, das Komplementsystem sowie verschiedene Zellen wie Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese Zellen sind zum Teil in der Lage, Pathogene selbst zu eliminieren. Besteht die Infektion fort, induzieren sie unter Beteiligung von Zyto- und Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Interferon das klinische Bild einer Entzündung im infizierten Gewebe. Darüber hinaus aktivieren sie das adaptive Immunsystem, das die Infektion stoppen kann, und tragen zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses bei (Janeway 2002).

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch eine große Anpassungsfähigkeit gegenüber den Mikroorganismen aus und entwickelt sich erst im Laufe der Immunantwort und des individuellen Lebens. Antigenspezifische Effektorzellen, die B- und T-Lymphozyten, können spezifische Strukturen der Pathogene erkennen und gezielt zelluläre Abwehrmechanismen und molekulare Antikörper bilden. Das Repertoire an Antigenerkennungsmechanismen in der Gesamtheit dieser Zellpopulation ist sehr groß, da durch den Prozess der somatischen Rekombination jeder Lymphozyt mit einem strukturell einzigartigen Antigenrezeptor ausgestattet wird, indem verschiedene und in zahlreichen Ausprägungen vorhandene Segmente, die zusammen für einen B- oder T-Zell-Rezeptor kodieren, individuell zusammengesetzt werden. Die Variabilität durch Kombination verschiedener Segmente wird noch dadurch vergrößert, dass einzelne Nukleotide an den Verknüpfungsstellen der Segmente hinzugefügt oder entfernt werden, was als *junctional diversity* bezeichnet wird. Trifft nun ein Lymphozyt auf sein passendes Antigen, beginnt ein Prozess der Vermehrung und Differenzierung, der als klonale Selektion bezeichnet wird. Durch somatische Hypermutation - Punktmutationen im Rezeptorbereich - wird während dieser Vermehrung eine optimierte Anpassung an das Antigen gewährleistet. Durch den beschriebenen Prozess steht nun ein hoch spezialisierter Zellklon zur Bekämpfung eines Pathogens mit den Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems bereit. Bei Erstkontakt mit einem Antigen entsteht jedoch eine zeitliche Verzögerung von einigen Tagen bis zum Erreichen der Effektivität. In dieser Zeit steht das angeborene Immunsystem mit schnellen und unspezifischen Abwehrmechanismen bereit.

Die Anzahl verschiedener B- und T-Zell-Rezeptoren, die in einem Individuum im Laufe eines Lebens gebildet werden, wird in einem Bereich von 10^{14} - 10^{18} vermutet. Durch diese enorme Variabilität vorhandener Rezeptoren existieren mit großer Wahrscheinlichkeit Erkennungsmechanismen für viele Pathogene (Chaplin 2006).

Ein besonderes Kennzeichen des adaptiven Immunsystems ist neben der Spezifität die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses durch die Persistenz sogenannter

Gedächtniszellen, um zukünftig denselben Mikroorganismus mit kürzerer Reaktionszeit und effektiverer Abwehr unschädlich zu machen.

Zur Erregererkennung benötigt das adaptive Immunsystem Antigen-präsentierende Zellen (APCs). Die wichtigsten APCs sind hochspezialisierte dendritische Zellen, die zum angeborenen Immunsystem gehören. Sie sind in der Lage, naiven T-Zellen Antigene in Form eines Peptid-MHC-Komplexes auf der Oberfläche zu präsentieren und dadurch eine spezifische Immunantwort zu induzieren. Somit stellen sie eine entscheidende Verbindung zum adaptiven Immunsystem dar.

2.2 Pathogen-assoziierte molekulare Muster und ihre Rezeptoren

Die Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ des angeborenen Immunsystems erfolgt über sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP = *pathogen-associated molecular patterns*). PAMP weisen mehrere gemeinsame Charakteristika auf, die für das Verständnis der Pathogen-Erkennung entscheidend sind (Medzhitov 2000):

- Sie repräsentieren als konservierte molekulare Muster Stoffwechselprodukte, die spezifisch für bestimmte mikrobielle Pathogene sind und im Wirtsorganismus nicht auftreten. Beispiele dafür wären Peptidoglykan und Lipopolysaccharid (LPS), die z. B. in Bakterien vorkommen.
- PAMP sind meist für das Überleben der Mikroorganismen essenziell und mutieren trotz enormen Selektionsdrucks nicht. Während der Evolution des angeborenen Immunsystems wurden sie als Erkennungsmuster ausgewählt.
- Größere Gruppen von Mikroorganismen besitzen dieselben PAMP, so dass sie häufig eine bestimmte Pathogenklasse charakterisieren.

Die Erkennung von PAMP erfolgt durch Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr, den sogenannten *Pattern recognition receptors* (PRR). Verschiedene APCs wie Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und B-Zellen exprimieren diese PRRs. Dies ermöglicht die präzise Unterscheidung von eigenen Molekülen und Pathogen-assoziierten fremden Strukturen. Das Expressionsmuster ist jedoch nicht klonal verteilt, sondern alle Zellen einer bestimmten Subpopulation exprimieren Rezeptoren einer identischen Spezifität. PRRs sind strukturell und funktionell heterogene Proteine (Medzhitov 1997). Sie beteiligen sich an der Opsonisierung von Bakterien und Viren zur Phagozytose sowie an der Komplementaktivierung. Außerdem ermöglichen sie die Aufnahme durch dendritische Zellen und triggern Signalkaskaden, die zur Transkription

zahlreicher, an der Immunantwort beteiligter Gene führt. Dazu zählen neben antimikrobiellen Peptiden auch inflammatorische Zytokine (Fraser 1998; Stahl 1998). Entscheidend ist die zeitlich unmittelbare Immunantwort, im Gegensatz zur später erfolgenden adaptiven Reaktion.

Heute sind verschiedene Rezeptor-Familien, die zu den PRRs zählen, bekannt: die Lektin- (Banchereau 2000), die *Scavenger*- (Peiser 2002), die Toll-like Rezeptoren (Barton 2002) sowie die neu entdeckten Familien der RNA-Helikasen (Creagh 2006) und *Nod-like*-Rezeptoren (Fritz 2006).

2.2.1 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Toll-like Rezeptoren (TLRs) zählen zu den PRRs, die Pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennen. Der erste Rezeptor aus dieser Familie (mittlerweile sind zehn Rezeptoren bekannt) wurde in der *Drosophila*-Fliege entdeckt und als Transmembranprotein beschrieben, das die dorso-ventrale Ausrichtung in der Embryonalentwicklung kontrolliert (Hashimoto 1988). Der Toll-Signalweg spielt allerdings auch in der Immunabwehr der Fruchtfliege eine entscheidende Rolle: mutierte Fliegen weisen einen Defekt in der antifungalen Abwehr auf und sind damit sehr anfällig für Pilzinfektionen (Lemaitre 1996). Medzhitov entdeckte 1997 einen homologen Transmembran-Rezeptor in Vertebraten, den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), der Lipopolysaccharide (LPS) in der Zellwand gramnegativer Bakterien erkennt. Poltorak et al. konnte als erster zeigen, dass Mäuse mit spontaner Mutation des TLR4-Gens nicht auf LPS-Stimulation reagierten und somit einen sonst tödlichen Endotoxin-Schock schadlos überstanden (Poltorak 1998).

Alle TLRs weisen wichtige strukturelle Charakteristika auf: sie bestehen aus einer extrazellulären, Leuzin-reichen (LRR) sowie einer intrazellulären Toll/IL-1-Rezeptor (TIR) Domäne (Takeda 2003). Die große Ähnlichkeit des intrazellulären Rezeptorabschnittes zwischen den TLRs und dem IL-1-Rezeptor setzt sich über die Rezeptorstruktur hinaus in der aktivierten Signalkaskade fort. Dies erfolgt über mehrere Zwischenschritte, welche die Aktivierung von Adapterproteinen und Kinasen einschließen. Initial steht dabei die Rekrutierung von MYD88 (*myeloid differentiation factor 88*) zu der TIR-Domäne des TLR, gefolgt von der Aktivierung des IRAK-TRAF6-Komplexes. Dies führt wiederum zur Aktivierung des MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)- sowie des IKK (Inhibitor der NFκB-Kinase)-Komplexes (Hacker 2000; Klinman 2005). Schließlich werden der Transkriptionsfaktor *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) und die MAPK-Kinasen aktiviert und somit Entzündungsreaktionen bzw. der Beginn einer Immunantwort initiiert (siehe Abb. 2).

1998 konnte in einer Reihe von Experimenten die Bedeutung des Adapterproteins *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) für die Signaltransduktion durch TLRs gezeigt werden: In MyD88-defizienten Mäusen blieb eine inflammatorische Antwort auf Stimulation mit IL-1 aus (Kawai 1999). Ebenso verhielt es sich durch Stimulation mit Lipoproteinen, Peptidoglykanen, CpG-DNA, Imidazoquinolinen und Flagellin (Hacker 2000; Takeuchi 2000).

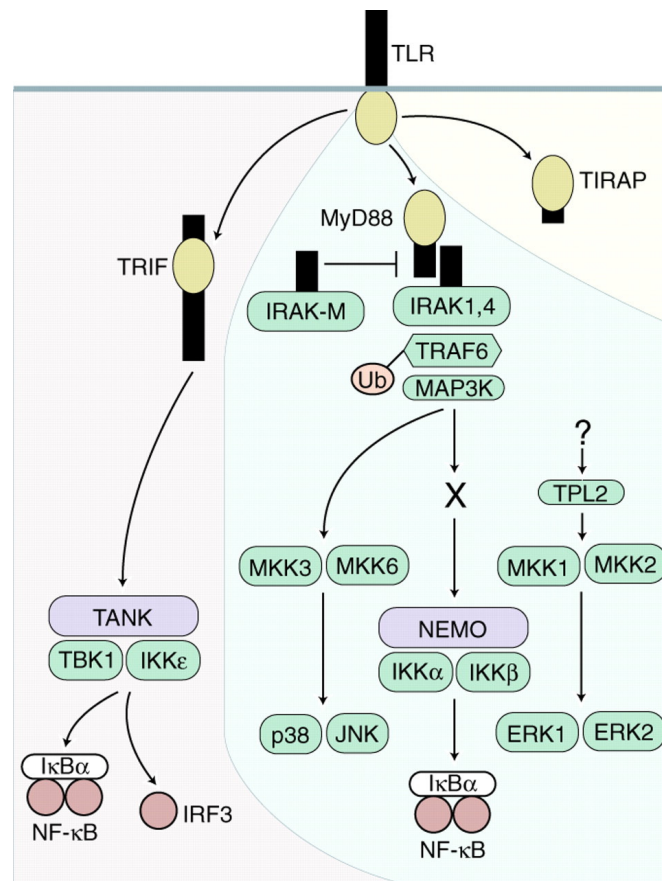


Abb. 2: Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren (nach Takeda 2003)

TLRs rekrutieren die IL-1R-assoziierte Kinase 1 und 4 (IRAK 1/ 4) über das Adapterprotein MyD88, welche dann wiederum den TNFR-assoziierten Faktor 6 (TRAF 6) phosphorylieren und aktivieren. In Abhängigkeit von TRAF 6 kommt es schließlich über mehrere Zwischenschritte zur Aktivierung der Stresskinasen c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und p38, der *extra-cellular signal-regulated kinase 1/ 2* (ERK 1/ 2) und des *inhibitor of NF-κBα* (IκBα)-Komplexes. Über letzteren Komplex kommt es zu einer Translokation von NF-κB in den Nukleus und damit zu einer Transkription von NF-κB-abhängigen Genen wie Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), Interleukin (IL)-1 und IL-6. MyD88-unabhängig kommt es via TRIF ebenfalls zu einer Aktivierung des IκBα-Komplexes und zusätzlich zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3.

Verschiedene TLRs können jedoch eine unterschiedliche Genexpression in dem gleichen Zelltyp induzieren. Auch zeigte sich, dass in MyD88-defizienten Mäusen zwar die TLR-vermittelte Zytokinproduktion aufgehoben ist, es aber dennoch zu einer LPS-abhängigen Induktion von Interferon-induzierbaren Genen und der Ausreifung von

DCs kommt (Kawai 1999; Kaisho 2001). So scheint neben MyD88 das zusätzliche Adapterprotein *TIR domain-containing adapter protein* (TIRAP) zumindest für TLR2 und TLR4 in der Induktion proinflammatorischer Zytokine via NF- κ B notwendig zu sein (Yamamoto 2002). Auch das Adapterprotein *TIR domain-containing adapter inducing IFN- β* (TRIF) bewirkt MyD88-unabhängig über den *IFN regulatory factor 3* (IRF3) die Transkription von IFN Typ I. Dies scheint wiederum eine entscheidende Rolle in der Aktivierung via TLR3 und TLR4 zu spielen (Oshiumi 2003).

2.2.2 Die humanen TLRs und ihre Liganden

Mittlerweile sind zehn Mitglieder der humanen TLR-Familie bekannt. Für die meisten TLRs wurden natürliche Liganden identifiziert, die als PAMP der Erkennung mikrobieller Strukturen durch das Immunsystem dienen (s. Tab. 1).

TLR	Ligand	Herkunft	Quelle
TLR1	kooperiert mit TLR2		(Wyllie 2000)
TLR2	Lipoproteine/-peptide Peptidoglykane Lipoteichonsäure Zymosan	versch. Path. grampos. Bakt. grampos. Bakt. Pilze	(Aliprantis 1999) (Aliprantis1999) (Aliprantis 2000) (Underhill 1999)
TLR3	Doppelstr. RNA	Viren	(Alexopoulou 2001)
TLR4	LPS Fusionsproteine Hitzeschockproteine Hyaluronsäure	gramneg. Bakt. Viren Wirt Wirt	(Poltorak 1998) (Kurt-Jones 2000) (Gallucci 2001) (Termeer 2002)
TLR5	Flagellin	Bakterien	(Hayashi 2001)
TLR6	kooperiert mit TLR2		(Hajjar 2001)
TLR7	Imidazoquinoline Einzelsträngige RNA	Synthetisch Viren	(Hemmi 2002) (Heil 2004)
TLR8	Imidazoquinoline Einzelsträngige RNA	Synthetisch Viren	(Jurk 2002) (Heil 2004)
TLR9	CpG-DNA	Mikrob. DNA	(Hemmi 2000)
TLR10	?	?	

Tab. 1: Humane TLRs und ihre Liganden

Bei der PAMP-Erkennung besteht eine Kooperation verschiedener TLRs, die einer größeren Variabilität erkannter Muster und der Modulation der vermittelten Immunantwort dient (Hajjar 2001). So kooperiert TLR2 mit TLR1 und TLR6 bei der Bindung verschiedener Lipoproteine. Ein ähnlicher Mechanismus wird für TLR7, TLR8 und TLR9 angenommen, die in ihrer Struktur große Ähnlichkeiten aufweisen (Hemmi 2002).

Neuere Untersuchungen haben ferner ergeben, dass manche TLRs auch auf endogene Bestandteile reagieren wie Hitze-Schock-Proteine (HSP), die z. B. von beanspruchten oder geschädigten Zellen freigesetzt werden. HSP werden vermehrt bei unterschiedlichen Stresssituationen wie Hitzeschock, ultravioletter Strahlung, viralen und bakteriellen Infektionen ausgeschüttet und führen zu einer Steigerung der Sekretion proinflammatorischer Zytokine und der Expression kostimulierender Moleküle auf dendritischen Zellen und Makrophagen (Gallucci 2001).

Die verschiedenen TLRs unterscheiden sich in ihrer subzellulären Lokalisation. Während TLR1, TLR2 und TLR4 auf der Zelloberfläche lokalisiert sind und nach Aktivierung in Phagosomen aufgenommen werden, werden TLR7, TLR8 und TLR9 nicht auf der Oberfläche exprimiert (Hajjar 2002; Visintin 2001). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass TLR9 im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und nach Stimulation in endosomale bzw. lysosomale Kompartimente transloziert (Latz 2004).

2.3 Endogene Gefahrensignale und ihre Rezeptoren

Gefahrensignale (*danger signals*) wurden erstmals 1994 im Rahmen eines Modells postuliert, das behauptete, dass eine Immunantwort eher durch körpereigene, schädigende Substanzen als durch körperfremde ausgelöst werde (Matzinger 1994). Zu diesen zählen verschiedene Moleküle, die von gestressten, beschädigten oder nekrotischen Gewebezellen freigesetzt werden und die Aktivierung ruhender APCs induzieren, die wiederum über kostimulatorische Signale eine Immunantwort initiieren. Zu den ersten beschriebenen *danger signals* zählen CD40 Ligand (CD40L), TNF- α und IL-1 β , die von aktivierten T-Zellen hochreguliert bzw. freigesetzt werden (Caux 1994; Sallusto 1995).

Heute wird eine Einteilung in zwei große Untergruppen vorgenommen: exogene und endogene Gefahrensignale. Zu letzteren zählen Nukleotide, reaktive Sauerstoffmetabolite, Neuromediatoren, Interferone, Hitze-Schock-Proteine und viele mehr. HSP binden wie auch Lipopolysaccharid, ein Hauptbestandteil in der Wand gramnegativer Bakterien, an TLR4. Somit kann ein und derselbe Rezeptor sowohl endogene als auch exogene Gefahrensignale erkennen. Unterschieden wird zwischen Signalen, die primär

eine Immunantwort initiieren und solchen, die ein positives Feedback geben, um eine Antwort zu verstärken oder zu modifizieren. Außerdem gibt es intra- und extrazelluläre sowie sezernierte Produkte. Einige sind konstitutiv vorhanden, andere werden erst neu synthetisiert, bevor sie DCs aktivieren können (Gallucci 2001).

2.3.1 Purinrezeptoren und Nukleotid-vermittelte Zellaktivierung

Auch intrazelluläre Nukleotide wie ATP und UTP, die entscheidend am Energiemetabolismus beteiligt und normalerweise im Zytosol lokalisiert sind, werden von einer Vielzahl von Zellen unter bestimmten Bedingungen wie Hypoxie, Ischämie, Inflammation oder sogar mechanischem Stress freigesetzt (Lazarowski 1997) und aktivieren DCs allein oder in Kombination mit TNF- α . Der Effekt dieser Nukleotide wird über bestimmte Purinrezeptoren, die von ruhenden DCs exprimiert werden, vermittelt (Coutinho-Silva 1999; Mutini 1999).

Purinrezeptoren werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt: P1-Rezeptoren, an denen hauptsächlich Adenosin als natürlicher Ligand bindet, und P2-Rezeptoren, die ATP, ADP, UTP und UDP erkennen.

Im Folgenden soll nur kurz auf die P2-Rezeptoren eingegangen werden. Diese werden wiederum in zwei große Untergruppen eingeteilt, basierend auf Unterschieden in den nachgeschalteten Signaltransduktions-Mechanismen und der molekularen Struktur. P2X-Rezeptoren sind an Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, P2Y-Rezeptoren an G-Proteine gekoppelt (Abbraccio 1994; Fredholm 1994).

P2X-Rezeptoren werden besonders dicht in erregbaren Geweben (glatte Muskulatur, Neuronen und Gliazellen) exprimiert und werden in weitere sieben Untertypen eingeteilt (Ralevic 1998). Sie bestehen aus zwei hydrophoben Transmembrandomänen, die durch einen großen extrazellulären Abschnitt miteinander verbunden sind. Die Signaltransduktion erfolgt durch schnellen Na⁺- und Ca²⁺- Einstrom bei gleichzeitigem K⁺-Ausstrom. Dies führt zu einer Depolarisation der Plasmamembran und einer Zunahme der intrazellulären Ca²⁺-Ionen-Konzentration, die zu einer Reihe weiterer Signalkaskaden führt (Di Virgilio 2001). Auf Grund der veränderten Membranpermeabilität gelangen dann die Ca²⁺-Ionen aus dem extrazellulären Raum in die Zelle. In Folge einer Aktivierung von P2Y-Rezeptoren wird hingegen Ca²⁺ aus intrazellulären Depots freigesetzt.

Bei den P2Y-Rezeptoren sind sechs Untereinheiten bekannt, die alle aus sieben Transmembrandomänen bestehen; der N-Terminus liegt extrazellulär, der C-Terminus zytoplasmatisch. Die Signaltransduktion innerhalb der P2Y-Rezeptorgruppe ist uneinheitlich. Alle P2Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. In der

weiteren Signaltransduktion kann es jedoch je nach Rezeptor zu einer Aktivierung oder Hemmung der Adenylatzyklase und/ oder zu einer Aktivierung der Phospholipase-C (PLC) kommen (Ralevic 1998).

2.3.2 Vorkommen und Funktion von Adenosin

Adenosin ist ein endogenes Nukleosid mit einer sehr kurzen Halbwertszeit (HWZ < 10 Sekunden). Es zählt wie ADP (Adenosin-5'-Diphosphat) und ATP (Adenosin-5'-Triphosphat) zu den extrazellulären Purinen. Zusammen mit den Pyrimidinen (UDP und UTP) vermitteln die Purine zahlreiche biologische Effekte, besonders im kardiovaskulären und zentralnervösen System. Die Rolle von Adenosin als ein extrazelluläres Signalmolekül wurde erstmals in einer Studie von Drury und Szent-Györgyi (1929) etabliert, in der sie zeigten, dass aus dem Herzmuskel extrahiertes Adenosin sowohl negativ inotrop als auch koronar vasodilatierend wirkt. Später wiesen unabhängige Forschergruppen nach, dass Adenosin im Herzen während Hypoxie und Ischämie freigesetzt wird und entscheidend an der reaktiv auftretenden Hyperämie beteiligt ist (Berne 1963; Gerlach 1963). Diese Erkenntnisse führten zu der Hypothese, dass Adenosin eine Schutzfunktion im Herzen zukommt. Zum einen mindert es die metabolischen Anforderungen des Myokards, zum anderen erhöht es den koronaren Blutfluss.

Adenosin wird während Entzündungsreaktionen von aktivierten oder gestressten Zellen freigesetzt und gilt inzwischen auch als wichtiger Modulator von Immunantworten, da es über die membrangebundenen Adenosinrezeptoren sowohl inflammatorische als auch anti-inflammatorische Effekte vermittelt. So kann es chemotaktisch wirken, die Freisetzung von allergischen Mediatoren, die Produktion von Sauerstoffradikalen, die T-Zell-Aktivierung und die Zytokinproduktion regulieren und ist außerdem in der Lage, die Expression von kostimulatorischen Molekülen sowie die Zytokin- und Chemokinproduktion in antigenpräsentierenden Zellen zu beeinflussen (Panther 2003; Schnurr 2004).

2.3.3 Der Adenosinrezeptor mit seinen Subtypen

Die Adenosin- bzw. P1-Rezeptor-Familie wurde entsprechend ihrer unterschiedlichen molekularen, biochemischen und pharmakologischen Strukturen in vier weitere Subtypen aufgeteilt: den A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Rezeptor. Alle P1-Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt. Sie bestehen aus sieben Transmembrandomänen hydrophober Aminosäuren. Wie auch bei den P2Y-Rezeptoren liegt der N-Terminus extrazellulär,

der C-Terminus zytoplasmatisch. Bindet Adenosin an den A_1 - oder auch A_3 -Rezeptor, resultiert daraus über $G_{i/o}$ -Proteine eine Inhibition der Adenylatzyklase und damit eine Reduktion des *second messengers* cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat). Der entgegengesetzte Effekt tritt über A_2 -Rezeptoren ein, an denen es über G_s -Proteine zu einer Stimulation der Adenylatzyklase und damit zum Anstieg von cAMP kommt. Gerade bei dem A_1 -Rezeptor sind jedoch noch weitere Signalkaskaden bekannt, da er an verschiedene G-Proteine innerhalb der $G_{i/o}$ -Familie bindet. So induziert die Aktivierung der Phospholipase-C über den Phosphoinositol-Metabolismus eine gesteigerte Produktion von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) und über die Produktion von IP_3 eine Kalziummobilisation aus endogenen Speichern (Ralevic 1998; Fredholm 2001). Eine Übersicht über alle vier Adenosinrezeptor-Subtypen bezüglich ihrer G-Protein-gekoppelten Effekte gibt Tabelle 2.

	A₁	A_{2A}	A_{2B}	A₃
G-Protein-gekoppelte Effekte	$G_{i/o}$	G_s	$G_s G_q$	$G_i G_q$
	cAMP ↓	cAMP ↑	cAMP ↑	cAMP ↓
	IP_3 ↑		IP_3 ↑	IP_3 ↑
	K^+ ↑			
	Ca^{2+} ↓			
Affinität zu Adenosin	hoch	hoch	niedrig	niedrig

Tab. 2: G-protein-gekoppelte Effekte der Adenosinrezeptor-Subtypen

3 Chemokine als Koordinatoren des Immunsystems

3.1 Klassifikation und Struktur von Chemokinen und ihren Rezeptoren

Die Funktion des Immunsystems wird entscheidend durch die präzise aufeinander abgestimmte Fähigkeit der Zellmigration, der Zelllokalisierung in bestimmten Geweben und der Interaktion zwischen den einzelnen Zellpopulationen bestimmt. Dabei spielt die große Familie der Chemokine und Chemokinrezeptoren sowohl unter homöostatischen wie auch inflammatorischen Konditionen eine bedeutende Rolle (Sallusto 2000).

Mittlerweile sind circa 50 Mitglieder der Chemokinfamilie bekannt, meist kleine lösliche Proteine mit einer Cysteinkonfiguration am N'-Ende innerhalb ihrer Aminosäuresequenz. Die meisten Chemokine verfügen über vier charakteristische Cysteine (Cys), wobei anhand des Motivs mit den ersten beiden Cysteinen die Klassifikation in vier Familien erfolgt: CXC (α), CC (β), C (γ) und CX3C (δ). X/X3 steht dabei für eine bzw. drei andere Aminosäuren. Zwei Disulfidbrücken werden zwischen dem ersten und

ritten und zwischen dem zweiten und vierten Cystein gebildet (Rossi 2000). Chemokine sind chemotaktische Zytokine, deren Signalvermittlung über G-Proteingekoppelte Rezeptoren, bestehend aus sieben Transmembrandomänen (7TMR), erfolgt. Entsprechend der Chemokinklassifikation werden auch die circa 20 Rezeptoren in CXCR, CCR, XCR und CX3CR eingeteilt. Tabelle 3 liefert eine Übersicht über die wichtigsten Chemokinrezeptoren mit ihren zugehörigen Liganden.

Chemokin-rezeptor	Chemokine	
	funktioneller Name	systematischer Name
CXCR1	GCP-2 IL-8	CXCL6 CXCL8
CXCR2	Gro- $\alpha/\beta/\gamma$ NAP2 ENA-78 IL-8	CXCL1/2/3 CXCL7 CXCL5 CXCL8
CXCR3	MIG IP-10 I-TAC	CXCL9 CXCL10 CXCL11
CXCR4	SDF-1	CXCL12
CXCR5	BCA-1	CXCL13
CCR1	MIP-1 α/β Rantes MCP-3	CCL3/4 CCL5 CCL7
CCR2	MCP-1 MCP-2 MCP-3 MCP-4	CCL2 CCL8 CCL7 CCL13
CCR3	Rantes Eotaxin MCP-4 MEC	CCL5 CCL11 CCL13 CCL28
CCR4	TARC MDC	CCL17 CCL22
CCR5	MIP-1 α/β Rantes	CCL3/4 CCL5
CCR6	MIP-3 α	CCL20
CCR7	ELC = MIP-3 β SLC = 6Ckine	CCL19 CCL21
CCR8	I-309	CCL1
CCR9	TECK	CCL25
XCR1	Lymphotactin	XCL1
CX3CR1	Fraktalkin	CX3CL1

Tab. 3: Chemokinrezeptoren mit den zugehörigen Liganden

3.2 Funktion von Chemokinen und Signalvermittlung

Die große Anzahl der Chemokine hat zu einer beträchtlichen Unklarheit bezüglich ihrer individuellen Relevanz und Funktion geführt. In ihrer Gesamtheit betrachtet sind sie an einer Vielzahl von immunologischen Prozessen beteiligt (siehe Abb. 3). Eine mögliche Einteilung basiert auf funktionellen Kriterien und unterscheidet zwischen inflammatorischen Chemokinen, die erst nach Aktivierung von zirkulierenden Leukozyten und anderen Zellpopulationen exprimiert werden, und homöostatischen Chemokinen, die konstitutiv vorhanden sind (Moser 2003 und 2004). Wiederum andere repräsentieren einen dualen Status mit zugleich homöostatischen und inflammatorischen Eigenschaften wie beispielsweise Fraktalkin, das konstitutiv im Gehirn exprimiert wird, aber auch durch TNF- α in Endothelzellen induziert werden kann (Bazan 1997).

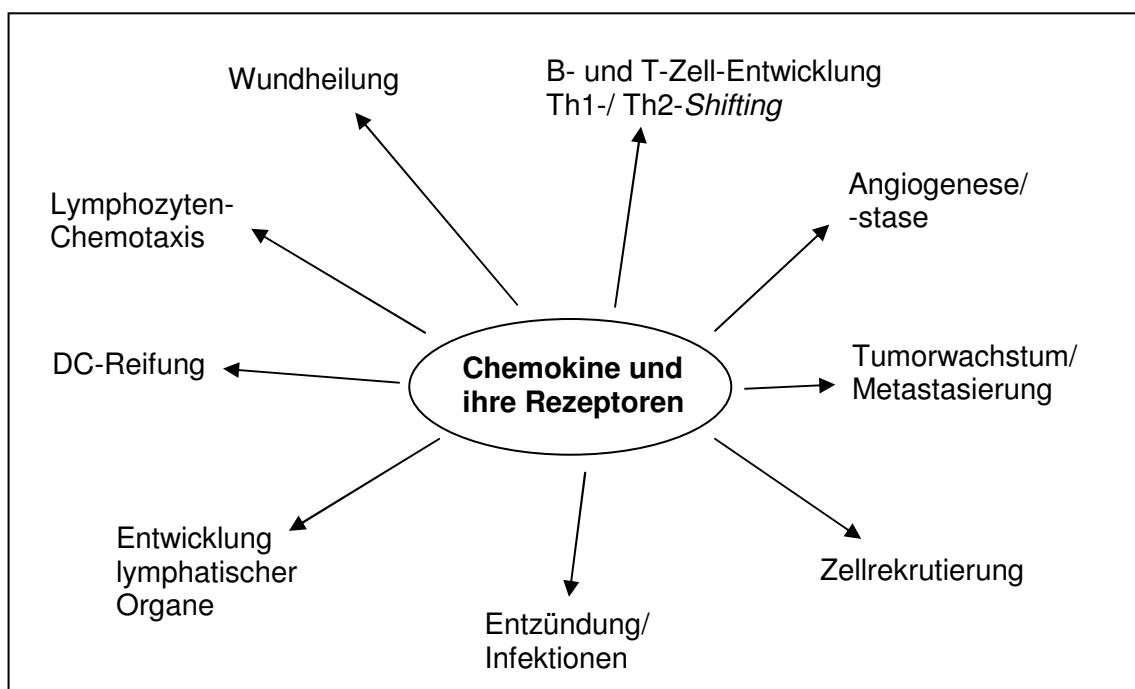


Abb. 3: Biologische Funktionen von Chemokinen und ihren Rezeptoren

Inflammatorische Chemokine wurden zuerst entdeckt. Sie locken neben Neutrophilen auch Effektor- und Memory-T-Zellen an. Inflammatorische Stimuli wie LPS, IL-1, IFN- γ und TNF- α , aber auch mikrobielle Moleküle oder Traumata induzieren besonders in Monozyten, Makrophagen sowie Epithel-, Endothelzellen und Fibroblasten eine starke Expression dieser Chemokine. Ihre Expressionsdauer ist jedoch limitiert bis die entsprechende Situation gelöst ist. Zu den klassischen Vertretern dieser Gruppe zählen IL-8, Rantes, Eotaxin, MIP-1 β , MCP-1 und IP-10, die bei verschiedenen

entzündlichen Erkrankungen produziert werden. So wird beispielsweise Eotaxin in großen Mengen in der Lunge bei allergischen Reaktionen freigesetzt (Jose 1994). Die proinflammatorische Antwort ist in der Tat die bekannteste Funktion der Chemokine und häufig mit einem Th1-Expressionsmuster (IFN- γ , IL-2, IL-12) assoziiert, das zur Infiltration von Th1-Zellen am Ort der Entzündung führt. Andere Chemokine hingegen werden spezifisch durch Th2-Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13) z. B. in Monozyten induziert. Dies spiegelt sich auch in der Chemokinrezeptorverteilung von Th1-/ Th2-Zellen wider: während Th1-Zellen CXCR3 und CCR5 exprimieren, finden sich auf Th2-Zellen CCR3, -4 und -8 (O'Garra 1998). Besondere Bedeutung kommt dabei dem Aktivierungszustand der Zellen zu: CXCR3 ist z. B. nur auf ruhenden Th1-Zellen präsent, während sich CCR8 auf aktivierten Th2-Zellen nachweisen lässt. Die Rezeptorexpression erfüllt dabei nicht nur den Zweck, die Migration zu dirigieren, sondern auch die Differenzierung zu beeinflussen, wie an Hand von MIP-1 α , einem CCR5-Liganden, in Richtung Th1-Phänotyp gezeigt werden konnte (Karpus 1997).

Im Kontrast dazu vermitteln mehrere Chemokine ein homöostatisches Milieu. Typischerweise werden sie trotz fehlenden inflammatorischen Stimuli exprimiert, und zwar von Zellen, die primär nicht an Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Sie koordinieren den kontinuierlichen Basalspiegel der Zellmigration, der für eine intakte Funktion des Immunsystems unabdingbar ist. Zusätzlich sind sie an komplexen Entwicklungs- und Migrationsprozessen, wie an der B- und T-Zell-Entwicklung innerhalb sekundär lymphatischer Organe beteiligt (Moser 2004). Auch in besonders gefährdeten Regionen des Körpers wie der Haut, der Darmmukosa und der Lunge werden sie konstitutiv exprimiert.

Trotz oder gerade wegen ihrer Schlüsselposition innerhalb des Immunsystems sind Chemokine und -rezeptoren mit einer Reihe von Krankheitsbildern assoziiert. Dazu zählen u. a. Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis, Rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen wie COPD und Asthma bronchiale, Transplantatabstoßungen, verschiedene Tumore und vaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose (Übersicht in Allen 2007). Auch HIV verwendet Chemokinrezeptoren als Kofaktoren, um in die Wirtszellen einzudringen (Lusso 2006).

Die Bindung von Chemokinen an ihre Rezeptoren triggert eine intrazelluläre Signalkaskade, die über Integrine zur festen Adhäsion der wandernden Zellen, zur Migration entlang von Chemokingradienten aus dem Blut ins Gewebe und schließlich zur Zell-abhängigen Aktivierung führt.

Zu Beginn der Signalkaskade steht die Aktivierung heterotrimerer G-Proteine mit den Untereinheiten α , β und γ . Die dissoziierten G α - und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten können

bestimmte Enzyme wie z. B. die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die ERK-MAP-Kinasen binden und aktivieren. PI3K aktiviert über viele Schritte die Proteinkinase-B (PKB), die bei Chemotaxis entscheidend ist und vermehrt an der Zellspitze nachgewiesen wurde (Thelen 2001). Der bekannteste Weg erfolgt über die Aktivierung der Phospholipase-C (PLC), die Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP_2) in Inositol-Trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP_3 bewirkt einen flüchtigen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und führt zur Öffnung von Kalziumkanälen in der Plasmamembran; zusammen mit DAG wird die Proteinkinase-C (PKC) aktiviert. Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ist wiederum der entscheidende Schritt in der Regulation der Zellmotilität (Mandeville 1997), indem sie ein Loslösen von Matrixmolekülen bewirkt. Wichtige Signaltransduktionswege, deren Aktivierung für mehrere Chemokine gezeigt werden konnten, sind in Abbildung 4 dargestellt. Die Feinabstimmung bei der Signalvermittlung ermöglicht die sehr große Anzahl verschiedener Antworten, die die Zahl der Chemokine und ihrer Rezeptoren weit übersteigt.

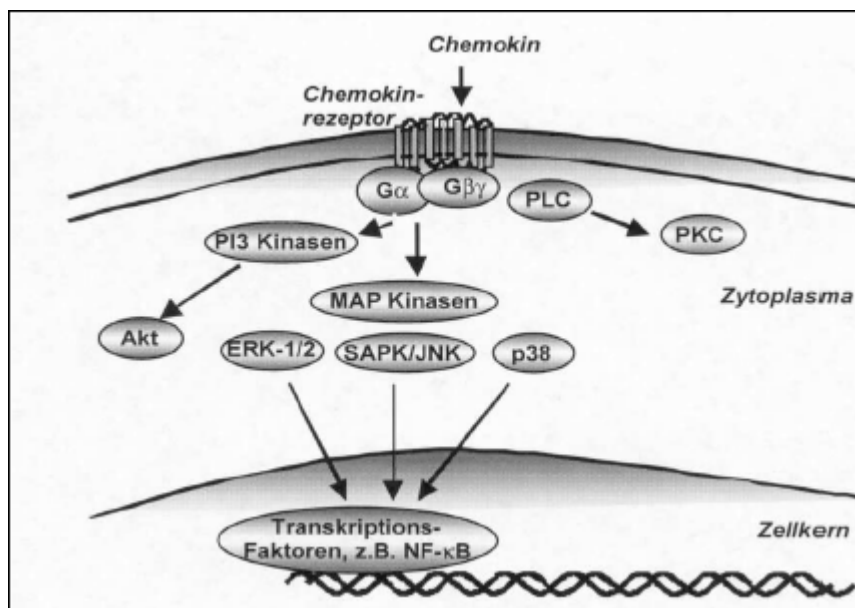


Abb. 4: Darstellung der wichtigsten Chemokin-induzierten Signaltransduktionswege (nach Thelen 2001)

4 Die dendritische Zelle (DC)

4.1 Die Familie der dendritischen Zellen

Definitionsgemäß besitzen dendritische Zellen (DCs) die Fähigkeit zum *Priming* naiver T-Lymphozyten, weshalb dieser Familie in der Initiierung einer Immunantwort gegenüber eindringenden Pathogenen eine bedeutende Rolle zukommt. Durch eine dichte Abdeckung der verschiedenen Gewebe des Körpers werden Antigene über PRRs erkannt und in sekundäre lymphatische Organe transportiert, um dort den T-Zellen präsentiert zu werden. Dadurch kommt es - je nach Aktivierungszustand der DC - zur Induktion einer spezifischen Immunantwort oder zur Induktion von Toleranz. Die Aktivierung und klonale Expansion eines für das jeweilige Antigen spezifischen T-Lymphozyten, das *Priming* naiver T-Lymphozyten, hat sowohl die Antigenpräsentation über MHC-Moleküle als auch das Vorhandensein kostimulatorischer Moleküle auf einer aktivierten APC zur Voraussetzung (Dhodapkar 2001). So entsteht über eine PAMP-getriggerte Aktivierung kostimulatorischer Signale auf DCs und darauf folgender Aktivierung von T-Zellen eine Verknüpfung zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Voraussetzung für diesen Prozess ist die Expression eines breiten Spektrums an PRRs durch verschiedene DCs, welche die Erkennung verschiedenster Pathogene gewährleistet.

4.2 Subpopulationen dendritischer Zellen

Die Familie der DC umfasst eine heterogene Gruppe von Zellen, die sich je nach Entwicklungsstufe und Herkunft in ihren spezifischen Eigenschaften und Funktionen unterscheiden. So existieren je nach Stadium der Differenzierung Stammzellen im Knochenmark sowie Vorläuferzellen im Blut und im lymphatischen Gewebe, die nach Aktivierung große Mengen von Zytokinen produzieren. Hinzu kommen gewebständige unreife DCs mit der Fähigkeit zur Aufnahme von Antigen und reife DCs, deren Hauptaufgabe die Antigenpräsentation in sekundären lymphatischen Geweben ist. Beim Menschen existieren mindestens zwei phänotypisch zu unterscheidende Subpopulationen an DCs, die myeloide unreife CD11c⁺ DC (MDC) und die CD11c⁺ plasmazytoide DC (PDC) (O'Doherty 1994). Tabelle 4 zeigt wie sich die beiden Subpopulationen durch phänotypische und funktionelle Charakteristika unterscheiden (Spits 2000).

Phänotyp	PDC = IPC	MDC
Myeloide Marker		
CD11b	-	+
CD11c	-	+
CD13	-	+
CD14	-	-
CD33	-	+
Weitere Antigene		
CD4	++	+
CD45RA	+	-
CD45RO	-	+
IL-3R	+++	+
GM-CSFR	+	++
PRRs		
TLR1	+	+
TLR2	-	+
TLR3	-	++
TLR4	-	+
TLR5	-	+
TLR6	+	+
TLR7	++	-
TLR8	-	++
TLR9	++	-
TLR10	+	+
Mannose R	-	+/-
BDCA2	+	-
CD1a, b, c, d	-	- +/-
Funktion		
IFN α / β -Produktion	++++	+
IL-12-Produktion	-	++
Phagozytose	-	++

Tab. 4: Phänotypische und funktionelle Charakteristika von PDC und MDC

4.3 Die Entdeckung der plasmazytoiden dendritischen Zelle (PDC)

Plasmazytoide dendritische Zellen (PDCs) bilden neben den klassischen myeloiden dendritischen Zellen (MDCs) und den Langerhanszellen eine wichtige Untergruppe der DCs. Lennert und Remmele beschrieben erstmals im Jahr 1958 histologisch die „T-assoziierte Plasmazelle“ (Lennert 1958). Sie hatten eine Zelle mit Plasmazell-ähnlicher Morphologie in den T-Zell-Regionen reaktiver Lymphknoten gesehen. 25 Jahre später fand Feller et al. heraus (Feller 1983), dass die genannte Zelle CD4 (*cluster of differentiation*) - einen Marker für T-Helferzellen (Th-Zellen) - exprimierte, weshalb er vermutete, sie würde den Gegenspieler zur Plasmazelle bilden. Er benannte sie in „plasmazytoide T-Zelle“ um. Doch auch bei dieser Namensgebung blieb es nicht, da die Zelle nicht CD3 des T-Zell-Rezeptors exprimierte, dafür hingegen MHC-Klasse-II

(*major histocompatibility complex*) und einige myeloide Oberflächenmarker wie CD31, CD36 und CD68. Dies führte zum Namen „plasmazytoider Monozyt“ (Facchetti 1988).

Genauere Untersuchungen ergaben, dass es sich um eine CD11c-negative und IL-3R α -positive Zelle handelte, die in den T-Zell-Regionen um hoch-endotheliale Venolen (HEV, *high endothelial venules*) lokalisiert ist und mit IL-3 und CD40-Ligand (CD40L) zur Ausdifferenzierung eines dendritischen Phänotyps gebracht werden kann und deshalb letztlich die Bezeichnung plasmazytoide dendritische Zelle (PDC) erhielt (Grouard 1997). Es stellte sich heraus, dass diese Zelle mit der vorher beschriebenen CD4-positiven, CD3-negativen und CD11c-negativen pre-DC sowie der HLA-DR-positiven und CD11c-negativen DC aus dem Blut identisch ist.

4.4 Funktionelle Charakteristika der PDC

4.4.1 Interferonproduktion

Obwohl die PDC unter den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) mit lediglich 0,1 % eine sehr seltene Zellpopulation darstellt, hat sie als Hauptproduzent von systemischem Typ I Interferon eine zentrale Stellung im Rahmen einer viralen Immunantwort.

Die Frage nach der Funktion der PDC konnte 1998 durch den Beweis geklärt werden, dass es sich bei der PDC und der *Interferon-producing cell* (IPC), die seit den späten 70er Jahren als wichtigste IFN- α -produzierende Zelle im peripheren Blut bekannt war, um ein und denselben Zelltyp handelt (Siegal 1999; Coccia 2004). Obwohl verschiedene Zellpopulationen nach einer entsprechenden Virusinfektion z. B. mit Herpes simplex-Virus (HSV) befähigt sind, geringe Mengen an Typ1-IFN zu produzieren, erreicht die PDC 100 - 1000 mal höhere Mengen und zwar 3-10 pg/ Zelle innerhalb von 24 Stunden. TNF- α und IL-6 werden hingegen nur in moderaten Mengen produziert.

Zwischen vier und zwölf Stunden nach viraler Stimulation kodiert ca. 50% aller mRNA, die in PDCs nachweisbar ist, für Typ1-IFN, darunter alle Untereinheiten wie IFN- α , - β , - ω , - λ und - τ . Nach Stimulation von TLR7 oder -9 durch virale Nukleinsäuren kommt es vor allem während der ersten 24 Stunden zur Produktion großer Mengen an IFN- α . Während der nächsten 48 bis 72 Stunden erfolgt das Ausreifen zu einer dendritischen Zelle, die IFN- α nur noch in kleineren Mengen produziert. Außerdem werden diese aktivierten PDCs refraktär für eine zweite Stimulation mit demselben oder einem anderen Virus (Kadowaki 2000). Phagozytose und Pinozytose werden bei der ausgereiften PDC nur in sehr eingeschränktem Maße beobachtet (Grouard 1997).

Die Fähigkeit der PDC zur IL-12-Produktion bleibt weiterhin umstritten. Während bestimmte Studien eine IL-12-Produktion auf Stimulation mit LPS, CD40L sowie CpG-B und CD40L zeigen (Cella 1996; Krug 2001b), postulieren andere Autoren eine strikt getrennte Spezialisierung von PDC und MDC auf die Produktion von IFN- α bzw. IL-12 (Ito T 2004).

4.4.2 Vermittlung einer T-Zell-regulierten Immunantwort

Unreife PDCs exprimieren nur sehr niedrige Level an MHCII, CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche und besitzen nicht die Fähigkeit, die Generierung von Antigen-spezifischen T-Zellen in signifikanter Weise zu stimulieren. Während einer antiviralen Immunantwort können PDCs aber über ihre Typ1-IFN-Produktion die Funktion von NK-, B-, T-Zellen und MDCs fördern. Zu einem späteren Zeitpunkt einer viralen Infektion differenzieren sie zu reifen dendritischen Zellen, die in hohem Ausmaß MHCII, CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche präsentieren; sie regulieren direkt die T-Zell-Funktion und verbinden somit angeborene mit adaptiver Immunantwort.

Über zwei bekannte Wege kann die auf IFN- α -Produktion spezialisierte PDC zu einer professionellen Antigen-präsentierenden Zelle ausreifen: über den IL-3-abhängigen sowie den IFN- α - und TNF- α -abhängigen Weg:

1) Unreife humane PDCs exprimieren verblüffend hohe Mengen an IL-3-Rezeptoren und reifen in Kultur mit IL-3 oder IL-3 plus CD40L aus; CD40L wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Eine Aktivierung durch das CD40/ CD40L-Rezeptorsystem charakterisiert - bzw. im Falle der Verwendung von rekombinantem CD40L simuliert - daher die reziprok stimulierende Interaktion von PDCs mit aktivierten T-Zellen (Grouard 1997; Olweus 1997).

2) PDCs exprimieren TLR7 und TLR9. Virusinfektionen oder synthetische CpG-ODN induzieren über diese Rezeptoren eine Signalkaskade, die die PDC zur IFN- α - und TNF- α -Produktion anregt. Diese beiden Zytokine bewirken ihrerseits auf auto-/ parakrinem Weg das Ausreifen der PDC (Kadowaki 2000).

Die reife PDC erlangt die Fähigkeit, mit T-Zellen zu interagieren. Während mit IL-3 und CD40L gereifte PDCs überwiegend naive CD4⁺ T-Zellen zur Produktion von IL-4, IL-5 und IL-10 anregen (Rissoan 1999) und somit eine Entwicklung in Richtung Th2-Zellen begünstigen, induzieren Virus-stimulierte reife PDCs über den IFN- α -abhängigen Weg in naiven CD4⁺ T-Zellen eine Th1-*Schiftung*, die mit IFN- γ - und IL-10-Synthese verbunden ist (Kadowaki 2000, siehe Abb. 5A). In Einklang mit dieser Beobachtung konnte bisher ein *Priming* von CD8-T-Zellen durch CpG-aktivierte PDCs nur für

endogene Antigene und Peptide, nicht aber für exogene Antigene gezeigt werden (Salio 2004).

Eine weitere wichtige Rolle der PDC in der antiviralen Abwehr besteht in der Aktivierung von Monozyten und MDC durch Typ1-IFN, welche wiederum eine starke T-Zell-Antwort nach sich zieht (Liu 2005). Interessanterweise ist die Fähigkeit der Virus-gereiften PDC, in naiven $CD4^+$ T-Zellen IFN- γ zu produzieren, abhängig von Typ1-IFN, aber unabhängig von IL-12. Sowohl MDCs als auch PDCs besitzen die Kapazität, $CD4^+$ T-Zellen zur Produktion von IFN- γ anzuregen. Wie Abbildung 5B zeigt, verwenden bakteriell aktivierte MDCs dazu hauptsächlich IL-12, viral stimulierte PDCs Typ1-IFN.

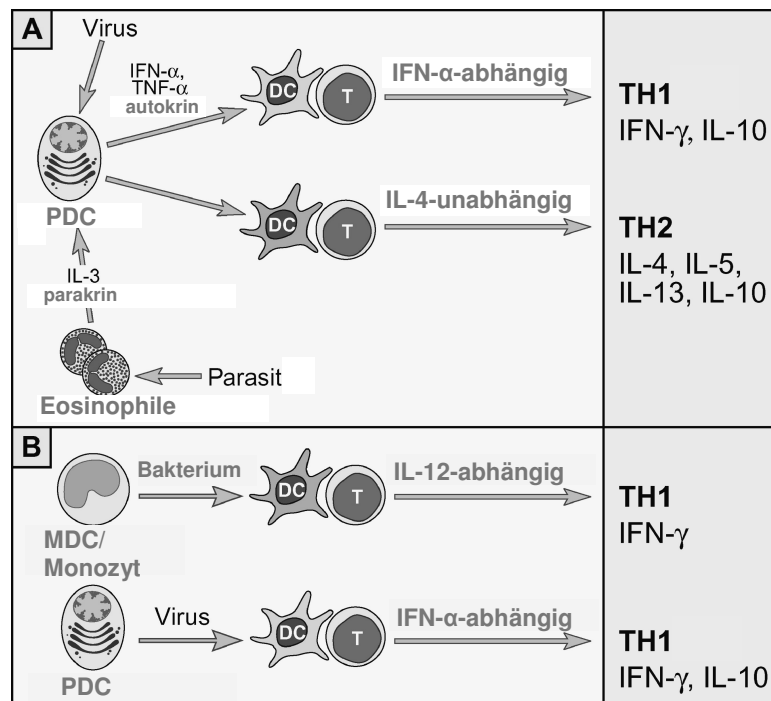


Abb. 5: Differenzierung von $CD4^+$ -T-Zellen mittels dendritischer Zellen (nach Liu 2005)

A) Virusinfektionen führen über die Freisetzung von IFN- α und TNF- α aus PDCs zur Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen in Th1-Richtung; parasitäre Infektionen hingegen generieren mittels PDCs eine Th2-Antwort. **B)** MDCs und PDCs können naive $CD4^+$ T-Zellen zur IFN- γ -Produktion anregen: MDCs via IL-12, PDCs via Typ1-IFN

PDCs sind nicht nur für die Aktivierung unterschiedlicher T-Zell-Stadien verantwortlich, sie wirken auch an der Entstehung von Toleranz mit. Die Präsentation von Alloantigenen durch IL-3- und CD40L-gereifte PDCs, induziert in $CD8^+$ T-Zellen eine IL-10-Produktion. Diese T-Zellen ähneln regulatorischen T-Zellen, weisen nur eine sehr spärliche zytolytische Aktivität auf und sind einer weiteren Stimulation unzugänglich (Gilliet 2002).

4.5 Lokalisation und Zirkulation der PDC

Plasmazytoide dendritische Zellen zirkulieren im Blut, sind aber auch in Lymphknoten oder sekundären lymphatischen Organen, wie Milz, Thymus oder Payerschen Plaques im Darm lokalisiert. Sie akkumulieren in entzündetem Gewebe, z. B. in der Haut bei Systemischem Lupus erythematodes (SLE) oder Psoriasis vulgaris (Wollenberg 2002). Außerdem infiltrieren sie entartetes Gewebe bei Malignem Melanom oder Kopf- und Halstumoren (Salio 2003).

Während fetale PDCs aus den primären lymphatischen Organen Leber, Thymus und Knochenmark isoliert wurden, scheint im erwachsenen Organismus hauptsächlich das Knochenmark für die Neubildung verantwortlich zu sein (Blom 2000). Von dort wandern sie unter normalen Bedingungen in die T-Zell-Zonen sekundärer lymphatischer Organe via HEV (hoch-endotheliale Venolen) in Lymphknoten (siehe Abb. 6). Dieses Wanderungsverhalten ähnelt B- und T-Lymphozyten. Im Kontrast dazu migrieren Monozyten und MDCs zunächst in nicht-lymphatische Gewebe, um dann nach ihrer Aktivierung über afferente Lymphgefäße ebenfalls die T-Zell-Zonen zu erreichen.

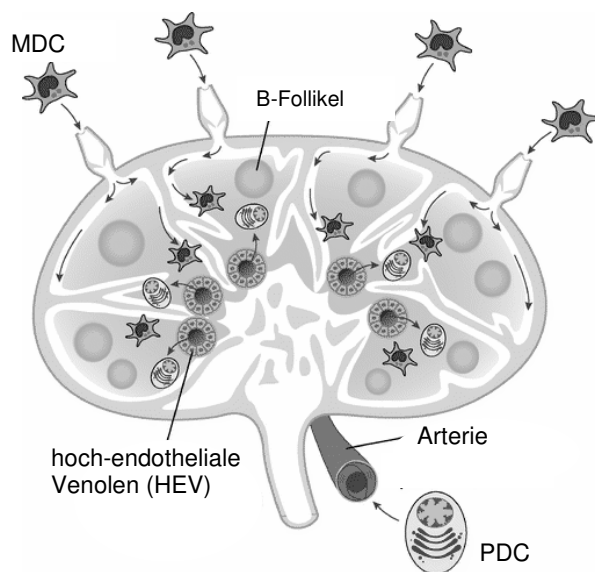


Abb. 6: PDCs und MDCs erreichen über unterschiedliche Wege den Lymphknoten
(nach Liu 2005)

4.6 Rezeptorexpression auf DCs

4.6.1 Chemokinrezeptoren und ihre Liganden auf PDCs

Unreife PDCs exprimieren mehrere Chemokinrezeptoren, allerdings je nach Aktivierungszustand in unterschiedlicher Stärke. Eine sehr hohe Intensität konnte für CC-Chemokin-Rezeptor (CCR)5, CCR7, CXC-Chemokin-Rezeptor (CXCR)3 und CXCR4, eine mittlere Intensität für CCR2 gezeigt werden (Penna 2001, Vanbervliet 2003). Tabelle 5 liefert eine Übersicht über die wichtigsten Chemokinrezeptoren auf PDCs und im Vergleich dazu auf MDCs.

Chemokin-rezeptor	PDC	MDC
CXCR1	-	-
CXCR2	+	-
CXCR3	+++	+
CXCR4	+++	++
CXCR5	-	-
CCR1	-	-
CCR2	++	++
CCR3	-	+
CCR4	-	-
CCR5	+++	+
CCR6	-	-
CCR7	+++	-

Tab. 5: Chemokinrezeptoren auf PDCs und MDCs

Chemokine nehmen eine entscheidende Position beim chemotaktischen Verhalten der PDCs ein. Aktivierte PDCs sezernieren vor allem die inflammatorischen Chemokine MIP-1 α/β und IL-8, sowohl auf synthetische TLR9-Liganden (CpG-B), als auch auf virale (inaktiverter Influenzavirus) und T-Zell-abhängige (CD40L) Stimuli hin (Penna 2002a und b). Krug et al. konnte dies zusätzlich für Rantes und die CXCR3-Liganden MIG und IP-10 zeigen (Krug 2002). MIP-1 α/β sind CCR1/5-Liganden und rekrutieren hauptsächlich Th1-gerichtete Effektorzellen, die wiederum die zugehörigen Rezeptoren exprimieren. Für die Wanderung unreifer PDCs selbst ist insbesondere der Rezeptor CXCR4 und sein Ligand, das homöostatische und in HEV von Lymphknoten exprimierte Chemokin SDF-1, bestimmend. So wird verständlich, warum PDCs überwiegend in den sekundären lymphatischen Organen lokalisiert sind und nicht wie MDCs schnell zu Entzündungsorten wandern (Cella 1999; Facchetti 1988).

4.6.2 Toll-like Rezeptoren auf DCs

Als Rezeptoren des angeborenen Immunsystems werden TLRs in genetisch determinierter Weise in bestimmten Kombinationen von verschiedenen Zellarten exprimiert. Ihrer Funktion entsprechend handelt es sich hierbei in erster Linie um Immunzellen. Auch in einer Vielzahl von anderen Gewebetypen spielen TLRs als Vermittler immunologischer Prozesse eine wichtige Rolle, wie z.B. im Lungenepithel, in der Darmmucosa und in Mesothelzellen (Zarembek 2002).

Die DC-Subpopulationen unterscheiden sich anhand ihrer Toll-like-Rezeptor-Expression (siehe auch Tab. 4). Während myeloide dendritische Zellen (MDCs) TLR1, -2, -4, -5 und -8 exprimieren, sind es auf plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs) hauptsächlich TLR7 und -9, in geringeren Mengen auch TLR1, -6 und -10 (Hornung 2002). TLR-9 konnte auf PDCs und B-Zellen nachgewiesen werden und erkennt CpG-DNA (DNA = Desoxyribonukleinsäure), mikrobielle DNA-Bestandteile, die eine Aktivierung und Ausreifung der Zellen nach sich ziehen (Hemmi 2000). Die genauere Charakterisierung der CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN) folgt in Kapitel 5. Die Tatsache, dass nach jetzigem Kenntnisstand TLR7 ausschließlich in Kombination mit TLR9 exprimiert wird, liefert einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Kooperation dieser beiden TLRs beim Erkennen von Nukleinsäuren.

Die Expression von TLRs unterliegt verschiedenen modulierenden Einflüssen wie dem Differenzierungsgrad einer Zelle, der Ausschüttung von Zytokinen oder dem Vorhandensein mikrobieller Stimuli. So führt die Sekretion von Typ1-Interferonen im Verlauf einer viralen Infektion zu einer verstärkten Expression von TLRs auf verschiedenen Immunzellen. Für die PDC ist ein Rückgang der TLR9-Expression im Laufe ihres Ausreifens - sei es durch Stimulation mit IL-3 oder CpG-DNA - beschrieben. TLR7 wird hingegen nach Ausreifen der PDC mit IL-3 vermindert, nach Stimulation mit CpG-DNA verstärkt exprimiert (Hornung 2002).

4.6.3 Adenosinrezeptoren auf DCs

In naiven und reifen myeloiden dendritischen Zellen gelang mittels PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) der Nachweis der mRNA-Expression des A₁-, A_{2a}- und A₃-Rezeptors (Panther 2001). Adenosinstimulation führt in MDCs und Makrophagen via A₁- und A₃-Rezeptoren zur Chemotaxis, zum intrazellulären Kalziumanstieg und zur Aktinpolymerisation und trägt damit zur Steuerung der Migration an Zielorte bei. Des Weiteren beeinflusst Adenosin jedoch auch die proinflammatorische Aktivität in MDCs und Makrophagen und kann über den A_{2a}-Rezeptor eine Inhibition der IL-12- und TNF- α -

Produktion bewirken. Nach dem Ausreifen von MDCs mit LPS kann der A_1 - und A_3 -Rezeptor nicht mehr nachgewiesen werden, während der inhibitorische Effekt via A_{2a} erhalten bleibt. In Übereinstimmung damit weisen reife MDCs in Gegenwart von Adenosin eine verminderte Fähigkeit auf, die Differenzierung von T-Zellen in Th1-Richtung zu fördern. Dies legt modulierende Effekte des Adenosins als Regulator des T-Zell-*Primings* nahe. Das Zusammenspiel unterschiedlicher Zellpopulationen mit ihren jeweiligen Adenosinrezeptoren ist in Abbildung 7 dargestellt.

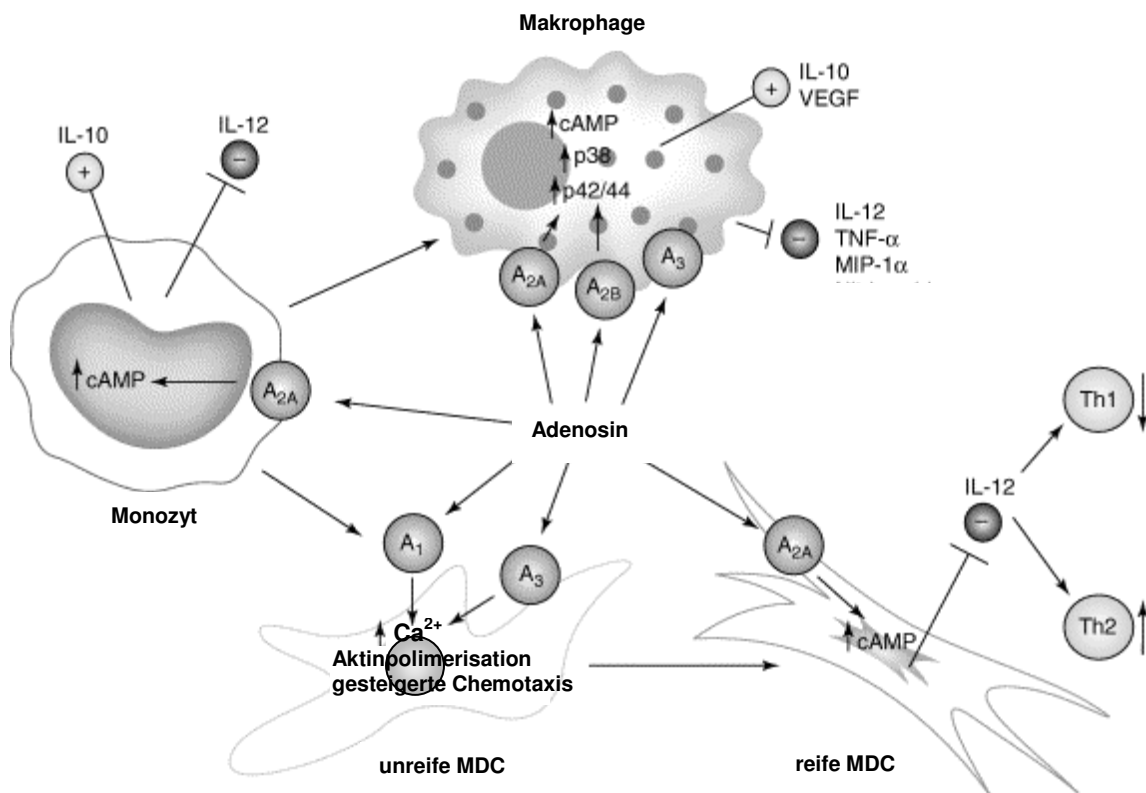


Abb. 7: Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und ihre Adenosinrezeptoren

(nach Hasko 2004)

Adenosin führt in Monozyten und Makrophagen zu einer verminderten IL-12- und zu einer erhöhten IL-10-Produktion. IL-12 zählt, wie auch TNF- α und MIP-1 α , zu den proinflammatorischen, IL-10 hingegen zu den antiinflammatorischen Zytokinen. Unreife MDCs werden durch Adenosin zur Chemotaxis angeregt. In reifen MDCs kommt es über den A_{2A} -Rezeptor ebenfalls zu einer IL-12-Suppression, was die Entwicklung von T-Zellen in Th1-versus Th2-Richtung vermindert.

4.7 Klinische Bedeutung der PDC

Mehrere Studien konnten einen Bezug zwischen der Häufigkeit und Funktion plasmazytoider dendritischer Zellen und dem Krankheitsverlauf herstellen. Anhand zweier Beispiele von Virusinfektionen, nämlich der HIV-Krankheit (HIV = *human immunodeficiency virus*) und dem Dengue-Fieber, soll die klinische Bedeutung der PDC unterstrichen werden.

Bei akuter wie auch chronischer HIV-Infektion kommt es zu einer progressiven Verminderung der PDC- und MDC-Zellzahl. Dies ist auch unter antiviraler Therapie nur teilweise reversibel. Es besteht eine indirekte Proportionalität zwischen der Anzahl der PDCs im peripheren Blut, ihrer Fähigkeit Interferon zu produzieren und der Viruslast. Funktionell betrachtet resultiert die verminderte IFN- α -Produktion HIV-infizierter Patienten sowohl aus einer Verminderung des pro PDC produzierten IFN als auch aus einer Reduktion der CD4⁺ Zellen, zu denen auch PDCs gehören (Barron 2003; Chehimi 2002). Eine chronische HIV-Infektion betrifft einerseits durch Infektion die Zahl plasmazytoider dendritischer Zellen selbst, andererseits beeinträchtigt sie ihre Zytokin-sezernierenden und T-Zell-aktivierenden Funktionen (Barron 2003, Chehimi 2002). Der Rückgang der IFN- α/β -produzierenden Zellen geht dabei mit einer erhöhten Anfälligkeit für opportunistische Infektionen einher (Siegal 2001). Ähnliche Betrachtungen lieferten HCV-infizierte Patienten (HCV = Hepatitis C-Virus) bzw. mit HIV und HCV koinfizierte Patienten (Anthony 2004). Konträr dazu weisen HIV-Langzeit-Überlebende höhere PDC-Zahlen auf als gesunde Spender (Levy 2003). Aus den gewonnenen Daten lässt sich folgern, dass die Funktion und die Anzahl der PDCs eine ganz entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung antiviraler Immunantworten spielen.

Das Dengue-Virus gehört zur Gattung der Flavi-Viren und wird von Moskitos übertragen. Während die Krankheit in Europa nur selten auftritt und dann meist von Tropen-Reisenden importiert wird, führt sie im asiatischen und südamerikanischen Raum immer noch zu Kindersterblichkeit, wenn es zu einer hoch-fieberhaften Erkrankung bis hin zum Dengue-hämorrhagischen Fieber kommt.

Sowohl bei nicht-humanen Primaten als auch bei Kindern - beide Gruppen mit mildem oder asymptomatischen Verlauf - konnte kurz nach der Infektion mit Dengue-Virus eine erhöhte Zahl zirkulierender PDCs beobachtet werden. Bei Kindern, die später Dengue-hämorrhagisches Fieber entwickelten, fehlte hingegen dieser frühe Anstieg der PDCs (Pichyangkul 2003). Lebende, aber nicht UV- oder Hitze-inaktivierte Flavi-Viren induzieren in PDCs IFN- α . Ob IFN- α/β essenziell ist, eine Progression der Erkrankung zu unterbinden, muss noch erforscht werden.

5 CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN)

5.1 CpG-DNA als Pathogen-assoziierte molekulare Muster

Im Jahr 1893 gelang es dem New Yorker Chirurgen William B. Coley mit einer Kombination aus Bakterienextrakten (Streptokokken-Lysate, später „*Coley's toxine*“ genannt), die Rückbildung von Tumoren bei Sarkom-Patienten zu induzieren (Coley 1991, *classic collection*). Durch die Imitation einer mikrobiellen Infektion konnte eine spezifische anti-tumorale Immunantwort verstärkt werden. Diese historische Entdeckung stellt den Anfang der CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN; p steht für Phosphatbindung) dar. CpG-Oligonukleotide sind synthetische Derivate mikrobieller DNA, die eine Immunreaktion verstärken können. Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) kodiert für das zelluläre Genom und bildet die Matrize für die Proteinbiosynthese. Deshalb wurde sie lange Zeit als reiner Informationsspeicher betrachtet, bis Tokunaga 1984 ihre immunstimulierende Wirkung entdeckte (Tokunaga 1984), als er bakterielle Lysate in ihre einzelnen Fraktionen auftrennte.

CpG-DNA, ein TLR9-Ligand, enthält die Nukleotid-Abfolge Cytosin-Guanosin in einem bestimmten Basen-Kontext und stellt einen weiteren Prototyp eines molekularen Musters (PAMP) dar mit dessen Hilfe das angeborene Immunsystem zwischen Selbst und Fremd unterscheiden kann. Da auch humane Zellen DNA besitzen, müssen deutliche Unterschiede zu mikrobieller DNA bestehen, um die Kriterien eines PAMP als einer konservierten mikrobiellen Struktur, die sich von humanen Strukturen unterscheidet, zu erfüllen (Krieg 2002):

- Während das Auftreten von CG-Dinukleotiden in humaner DNA unterdrückt wird und lediglich bei einem Viertel der statistischen Häufigkeit liegt (1:60), enthält die DNA der meisten Mikroorganismen CG-Dinukleotide gemäß der statistischen Wahrscheinlichkeit (1:16).
- In humaner DNA herrscht im Gegensatz zu mikrobieller DNA ein Basen-Kontext vor, in dem CG-Dinukleotide keine immunstimulatorische Aktivität besitzen, nämlich ein Cytosin vor und ein Guanosin nach der CpG-Sequenz.
- Ca. 70% der humanen CG-Dinukleotide sind an den Cytosinbausteinen methyliert, eine Modifikation, die ebenfalls der immunstimulatorischen Aktivität entgegenwirkt.

Synthetische Oligonukleotide (ODN) mit unmethylierten CpGs (CpG-ODN) bieten in Mäusen Schutz vor Infektionen mit intrazellulären Erregern wie Leishmanien oder Listerien (Krieg 1998; Zimmermann 1998). Folglich besitzen sie - der mikrobiellen DNA vergleichbar - immunstimulatorische Aktivität. Anhand von TLR9-depletierten Mäusen

konnte nachgewiesen werden (Hemmi 2000), dass CpG-ODN ihren immunstimulatorischen Effekt über TLR9 vermitteln; wenig später ließ sich dies auch für das humane System zeigen (Bauer 2001). Da unmodifizierte ODN instabile Strukturen sind, die schnell von Nukleasen abgebaut werden, ersetzt man beim Herstellen von synthetischen ODN die normalen Phosphodiester-Bindungen teilweise oder komplett durch Phosphothioat-Bindungen, die den Molekülen Nuklease-Resistenz verleihen (Stein 1988).

Im Laufe der Evolution haben sich die TLR9-Moleküle der verschiedenen Spezies auseinander entwickelt, so dass sich manche Spezies in den CpG-ODN-Sequenzen unterscheiden, die eine optimale stimulatorische Wirkung entfalten (Rankin 2001). Während diese Sequenzen im Menschen und in anderen Primaten weitgehend übereinstimmen, bestehen deutliche Unterschiede zwischen Menschen und Nagern. Auch die TLR9-exprimierenden, CpG-responsiven Zellarten können zwischen verschiedenen Spezies differieren; so stellen im humanen System und bei Primaten B-Zellen und PDCs die Zellarten dar, die direkt durch CpG-ODN aktiviert werden; hingegen werden direkte CpG-Effekte im murinen System zusätzlich über myeloide Zellen wie Makrophagen, Monozyten und myeloide dendritische Zellen vermittelt (Kadowaki 2001). *In vivo* Experimente mit CpG-ODN werden typischerweise mit Mäusen begonnen und besonders in Bezug auf therapeutische Anwendungen zur weiteren Evaluation in Primaten verlegt.

5.2 Einteilung der CpG-Oligonukleotide

CpG-Oligonukleotide stellen potente Aktivatoren von Immunzellen dar, wobei die immunstimulatorische Wirkung auf ein zentrales Cytosin-Guanin-Dinukleotid zurückzuführen ist, das in einen bestimmten Basenkontext eingebettet ist (Krieg 1995). Basierend auf strukturellen und funktionellen Charakteristika mit unterschiedlicher Wirkung auf die Zielzellen, werden CpG-ODN in verschiedene Klassen eingeteilt. Mittlerweile sind drei Klassen von ODN bekannt:

- 1) CpG-A ist charakterisiert durch Poly-G-(Guanosin)-Motive mit Phosphothioat-Bindungen am 3'- und 5'-Ende sowie einem Palindrom, das sich um ein zentrales CpG-Dinukleotid gruppiert und durch Phosphodiester-Bindungen verknüpft ist. Unter einer Palindromsequenz versteht man spiegelbildlich angeordnete Basen. Den Prototyp eines humanen CpG-A-ODN stellt ODN 2216 dar. Aufgrund der strukturellen Besonderheiten formieren sich CpG-A-ODN durch Ausbilden sogenannter G-Tetraden zu übergeordneten partikulären Strukturen (Kerkmann 2005). Diese liegen in der Größenordnung von Viren und erweisen sich unter physiologischen Bedingungen als

stabil. Die Bildung dieser Nanopartikel beeinflusst die zelluläre Lokalisation von CpG-A mit einer längeren Verweildauer in früh-endosomalen Kompartimenten (Honda 2005). Diese Eigenheit wird mittlerweile als verantwortlich für eine potente IFN- α -Induktion angesehen, da auch CpG-B-ODN, die experimentell zu höhermolekularen Strukturen zusammengefügt wurden, große Mengen an IFN- α induzieren.

2) Im Gegensatz zu CpG-A stellt CpG-B (ODN 2006) einen starken B-Zell-Aktivator dar und regt die B-Zelle zur Proliferation und Sekretion großer Mengen von IL-10 und IL-6 an. Die Produktion von Typ1-IFN ist hingegen gering. CpG-B besteht aus einem oder multiplen CpG-Motiven an einem Phosphothioat-modifizierten Rückgrat, wodurch eine höhere Nukleaseresistenz erreicht wird. Es enthält keine Poly-G-Sequenz (Krieg 2001) und bildet keine übergeordneten Strukturen aus. Eine Übersicht über die beiden CpG-Klassen liefert Tabelle 6.

	CpG-A	CpG-B
primäre Zielzelle	PDC	B-Zelle und PDC
Prototyp	ODN 2216	ODN 2006
Sequenz	5`GGgggacga: <u>tcgtc</u> GGGGGg 3`	5`TCGTCGTTTTGT CG TTTTGT CG TT 3`
Struktur	<ul style="list-style-type: none"> • chimäres Phosphodiester-/Phosphothioat-Rückgrat • Poly-G-Enden • zentrales Palindrom mit CG-Dinukleotid • Formation höhermolekularer Strukturen (G-Tetraden) 	<ul style="list-style-type: none"> • vollständiges Phosphothioat-Rückgrat • enthält das „optimale“ humane CpG-Motiv GTCGT
Wirkung	<ul style="list-style-type: none"> • induziert große Mengen Typ I-IFN in PDCs • schwache Aktivierung von B-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • starke Aktivierung von B-Zellen • induziert geringe Mengen Typ I-IFN in PDCs

Tab. 6: Charakteristika und Sequenzen der humanen CpG-Klassen

Großbuchstaben: Phosphothioat-; Kleinbuchstaben: Phosphodiesterbindung

Fett gedruckt: CpG-Motive; Unterstrichen: Palindrome; : = Zentrum des Palindroms

3) Vor wenigen Jahren wurde eine dritte Oligonukleotidklasse identifiziert. Wichtige strukturelle Merkmale von CpG-C sind ein zentrales Palindrom in Anlehnung an CpG-A sowie ein „TCGTCG“-Motiv am 5'-Ende in Anlehnung an CpG-B; dabei sind alle Basen durch Phosphothioate verbunden, was dem ODN eine größere Stabilität im Vergleich zu CpG-A verleiht. Diese ODN-Klasse zeichnet sich sowohl durch IFN- α -Induktion in der PDC als auch durch Aktivierung von B-Zellen aus und vereint somit die

Haupteigenschaften von CpG-A und CpG-B (Hartmann 2003). Die starke Aktivität in beiden Zielzellen lässt eine verbesserte immunmodulatorische Fähigkeit vermuten. Bezüglich der Aktivierung von B-Zellen in PBMCs erweist sich CpG-C sogar als CpG-B überlegen, was durch die indirekte Stimulation durch induziertes IFN- α erklärt werden kann.

5.3 Wirkung von CpG-ODN auf das Immunsystem

Beim Menschen reagieren nur B-Zellen und PDCs direkt auf die CpG-Stimulation (Hemmi 2000; Takeshita 2001; Hornung 2002) und initiieren dadurch eine Immunkaskade, in deren Verlauf es indirekt zur Reifung, Differenzierung und Proliferation von NK-, T-Zellen und Monozyten bzw. Makrophagen kommt. Zusammen sezernieren all diese Zellen Zyto- und Chemokine, die ein proinflammatorisches (IL-1, IL-6, IL-18 und TNF) und Th1-induzierendes (IFN- γ und IL-12) Milieu schaffen (Klinman 1996; Ballas 1996). Diese Effekte sind hoch spezifisch für CpG, da sie für DNA ohne unmethylierte CpG-Motive nicht nachweisbar sind.

Interessanterweise bestehen dabei deutliche Unterschiede zwischen den beiden CpG-Klassen. So induziert CpG-A in PDCs sehr große Mengen an Typ1-Interferon (Hartmann 2000), indem es eine Virusinfektion imitiert. Es kommt jedoch nur zu einer geringen Hochregulation der für die Ausreifung charakteristischen Oberflächenmarker *cluster of differentiation* (CD)80, CD86 und *major histocompatibility complex* (MHC)-II. IFN- α induziert die Antigen-unabhängige Aktivierung von Gedächtnis-CD8-T-Zellen (Hornung 2002), die Aktivierung und Interferon- γ -Produktion (IFN- γ) in natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und $\gamma\delta$ -T-Zellen und die Ausreifung und Entwicklung eines DC-ähnlichen Phänotyps in Monozyten (Krug 2003). Obwohl auch B-Zellen TLR9 exprimieren, zeigt CpG-A in diesen Zellen keinen Effekt; es scheint vielmehr den aktivierenden und protektiven Effekten von CpG-B entgegen zu wirken.

CpG-B induziert auf der PDC eine verstärkte Expression von kostimulatorischen (CD80, CD86, CD40) und Antigen-präsentierenden Molekülen (MHC-II) sowie eine erhöhte Sekretion von IL-8 und TNF- α , aber nur eine spärliche IFN- α -Produktion (Hemmi 2003; Kerkmann 2003). Zudem bewirkt es das Ausreifen (starke Expression von CD83), das Wachstumsfaktor-unabhängige Überleben in Kultur und Schutz vor IL-4-induzierter Apoptose. In Gegenwart von CD40L werden dendritische Zellen wie auch B-Zellen zur Produktion von IL-12 angeregt; dadurch wird eine bakterielle Infektion imitiert und durch das *Primen* naiver CD4⁺ T-Lymphozyten eine Th1-gerichtete Immunantwort herbeigeführt. Für B-Zellen stellt CpG-B einen extrem starken Stimulus dar: Es führt zum Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus, zur Zytokin-

Produktion sowie zur verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle wie dem Fcγ-Rezeptor, MHCII, CD80, CD86, CD40 und CD54 (Davis 1998). Während die IL-6-Sekretion für die Produktion von IgM benötigt wird, stellt die IL-10-Induktion einen Mechanismus zur Gegenregulation und zur Begrenzung der Aktivierung dar (Anitescu 1997).

Zusammenfassend besteht die Wirkung von CpG-ODN darin, ein starkes Th1-Milieu *in vitro* und *in vivo* zu schaffen, das sich durch die Anwesenheit von IFN und IL-12 auszeichnet. Eine Gegenüberstellung der beiden in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide CpG-B und CpG-A zeigt Abbildung 8.

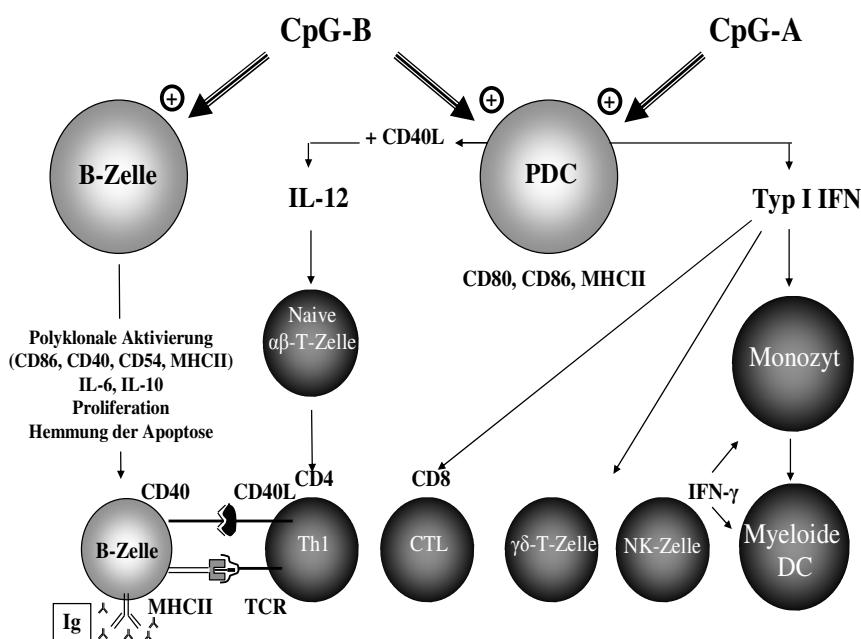


Abb. 8: Die unterschiedliche Wirkung von CpG-B und CpG-A auf die Zellen des Immunsystems (nach Rothenfusser 2003)

PDCs und B-Zellen werden direkt durch CpG-ODN stimuliert. Bei Monozyten, MDCs, T- und NK-Zellen erfolgt dies sekundär durch Zytokine, die von PDCs gebildet werden. CpG-A (ODN 2216) induziert die Produktion großer Mengen an IFN-α in PDCs, während CpG-B (ODN 2006) und CD40L synergistisch die IL-12-Freisetzung stimulieren. Dadurch wird das *Primen* naiver α/β-T-Zellen und ihre Differenzierung in Richtung Th1 verstärkt.

5.4 Molekulare Wirkmechanismen

Die Aufnahme von ODN in die Zelle erfolgt nach Anlagerung an DNA-bindende Proteine an der Zelloberfläche über Rezeptor-vermittelte Endozytose in einem aktiven und temperaturabhängigen Prozess (Hacker 1998). In Anwesenheit von Poly-G-Motiven erfolgt zusätzlich eine Aufnahme über *Scavenger*-Rezeptoren (Yao 1996).

An Latex- oder Gold-Kügelchen gebundene CpG-ODN werden an der Aufnahme in die Zelle gehindert und verlieren ihre immunstimulatorische Wirkung (Manzel 1999). In der Zelle sind ODN in endosomalen Kompartimenten lokalisiert. Hier lassen sich wiederum durch Substanzen wie Chloroquin, welche die Ansäuerung und Ausreifung der Endosomen verhindern, die stimulatorischen Effekte von CpG-DNA aufheben (Yi 1998). Nachdem die Erkennung über TLR9 zuerst in Mäusen als notwendige Voraussetzung für die Wirkung von CpG-ODN demonstriert werden konnte (Hemmi 2000), folgte bald die Bestätigung im Menschen; auch hier wurde TLR9 als notwendige Voraussetzung für die Vermittlung der CpG-ODN-induzierten Effekte identifiziert (Bauer 2001). In Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Konsequenzen einer Hemmung der Aufnahme von ODN in die Zelle oder einer Hemmung der endosomalen Ausreifung, konnte die Lokalisation von TLR9 in endosomalen Kompartimenten dargestellt werden (Ahmad-Nejad 2002).

5.5 Therapeutische Anwendung von CpG-ODN

Auf der charakteristischen Wirkungsweise von CpG-ODN und ihrer Th1-gerichteten immunstimulatorischen Wirkung beruhen zahlreiche therapeutische Strategien, die in Studien bereits untersucht wurden. Sowohl der prophylaktische Einsatz als Vakzine-Adjuvans, als auch die therapeutische Anwendung bei Tumorerkrankungen, die Stärkung des Immunsystems zur Infektabwehr und die Modifizierung der Immunreaktion bei allergisch bedingten Erkrankungen wurden untersucht.

1) Tumorthherapie: In verschiedenen Studien werden CpG-ODN als Monotherapie, als Adjuvans für Tumorstoffe und in Kombination mit spezifischen Antikörpern zur Verstärkung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität eingesetzt (Weiner 1997; Wooldridge 1997). Zudem bewirken sie ein förderliches Milieu in den drainierenden Lymphknoten und zeigen direkt antiproliferative Wirkung auf die Tumorzellen. Als Monotherapie konnten Studien in Mäusen eine therapeutische Wirkung von CpG-ODN nachweisen, wobei CpG-A v. a. Effekte gegen Tumoren zeigte, die sensibel auf NK-Zell-Aktivierung reagieren, wie Melanome, Kolon-Karzinome oder Mesotheliome, während die durch CpG-B vermittelte breitere Aktivierung des Immunsystems einen Rückgang von Lymphomen, Neuroblastomen oder Glioblastomen bewirkte (Ballas 2001).

2) Infektprotektive Aktivität: Die systemische Applikation von CpG-ODN verleiht Mäusen Immunität gegen verschiedene Pathogene (Klinman 1999). Ein entscheidender Beitrag zu diesem Schutz kommt der PDC zu: In Experimenten mit

Listerien-Infektionen konnte gezeigt werden, dass PDCs aus CpG behandelten Spendern nicht-behandelten Empfängern Immunität verliehen, wohingegen PDC-depletierte Spenderzellen dies nicht vermochten (Ishii 2005). Auch im immunsupprimierten, schwangeren oder neugeborenen Individuum scheinen CpG-ODN die Immunabwehr zu verstärken (Verthelyi 2003; Ito 2004).

3) Adjuvans für Vakzinierungen: Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die Verwendung von CpG-ODN als Impfadjuvans. Über die Induktion von Th1-proinflammatorischen Zytokinen und die Aktivierung und Ausreifung von Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) führt die Gabe von CpG mit verschiedenen Impfstoffen (z. B. gegen Influenza, Masern, Hepatitis B, Tetanus) zu einem Anstieg spezifischer Antikörper auf ein Vielfaches im Vergleich zur Kontrolle ohne CpG (Moldoveanu 1998).

4) Prävention und Therapie von Allergien: Allergische Erkrankungen wie Asthma bronchiale werden durch eine starke Produktion von Th2-Zytokinen wie IL-4 und IL-5 vermittelt. Durch Induktion einer Th1-Immunantwort, wie sie durch Stimulation mit CpG-ODN erreicht wird, lässt sich dieser Prozess verhindern oder abschwächen (Santeliz 2002).

Im Menschen werden derzeit vorrangig Phase I-Studien zur Evaluation der Arzneimittelsicherheit durchgeführt, die u. a. in der Frage einer erhöhten Gefahr von Autoimmunerkrankungen unter CpG-ODN mehr Klarheit bringen sollen. Erste Phase II-Studien konnten beispielsweise eine Verstärkung und Beschleunigung der Immunantwort auf die Hepatitis B Vakzine Engerix B zeigen (Klinman 2000).

6 Fragestellung

Dendritische Zellen zählen zu den Antigen-präsentierenden Zellen und haben eine Mittlerfunktion zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Die Erkennung von exogenen und endogenen Gefahrensignalen am Ort einer Infektion oder eines Zellschadens führt über Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems zur Aktivierung und Ausreifung dieser Zellen. Je nach Gefahrensignal und Art der dendritischen Zelle wird die Produktion unterschiedlicher kostimulatorischer Moleküle, Zytokine und Chemokine induziert; über die Interaktion mit T- und B-Zellen kommt es zu einer der jeweils auslösenden Situation angepassten Antwort des adaptiven Immunsystems. Das Auffinden der Gefahrenstelle und die Interaktion von DCs mit anderen Zellen des Immunsystems am richtigen Ort erfordert eine genau

koordinierte Steuerung der Migration von DCs und ihren Interaktionspartnern durch Chemokine und andere chemotaktisch aktive Substanzen.

Die plasmazytoide dendritische Zelle (PDC) bildet eine Untergruppe dendritischer Zellen, die durch ihre Fähigkeit der Erkennung viraler Nukleinsäuren über die Mustererkennungsrezeptoren TLR9 und TLR7 sowie durch ihre Fähigkeit zur Produktion großer Mengen an Interferon gekennzeichnet ist; sie besitzt daher eine zentrale Funktion in der Abwehr viraler Infektionen. PDCs sind aufgrund ihrer Bedeutung bei viralen Infektionen und der Wirkungsvermittlung synthetischer Agonisten von TLR9 (CpG-ODN) und TLR7, die bereits in klinischen Studien eingesetzt werden, in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses gerückt.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren sowohl die chemotaktischen Stimuli, auf die PDCs selbst reagieren, als auch die chemotaktischen Stimuli, die von PDCs produziert werden, unvollständig charakterisiert. Weitgehend unbekannt waren auch die Zielzellen, die durch eben diese Stimuli zum Wanderungsverhalten zu PDCs hin angeregt werden. Während die Aktivierung von PDCs durch exogene Gefahrensignale, insbesondere durch CpG-Oligonukleotide via TLR9, bereits gut beschrieben ist, gibt es nur wenige Daten über die Aktivierung von PDCs durch endogene Gefahrensignale. Vorarbeiten der eigenen und anderer Arbeitsgruppen (Panter 2001 und 2003) hatten die Wirkung von Adenosin auf myeloide DCs untersucht und sowohl chemotaktische Aktivität als auch funktionsmodulierende Effekte dieses endogenen Gefahrensignals beschrieben. Über die Wirkung von Adenosin auf PDCs oder die Expression von Adenosinrezeptoren auf PDCs war jedoch nichts bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb in geeigneten *in vitro*-Modellen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Welche Chemokine werden nach Stimulation durch das exogene Gefahrensignal CpG-ODN von aktivierten PDCs produziert und auf welche chemotaktischen Stimuli hin wandern PDCs?
- Welche Zellpopulationen werden von aktivierten PDCs zur Wanderung in Richtung PDC angeregt?
- Wie wirkt sich das endogene Gefahrensignal Adenosin auf die Chemotaxis und die Zytokinproduktion von PDCs aus und besteht eine Korrelation zu ihrer Adenosinrezeptor-Expression?

B Material und Methoden

1 Reagenzien, Chemikalien und Geräte

1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank (1384)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACSCalibur	Fa. Pharmingen/ Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Gene Quant RNA/ DNA Calculator	Fa. Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Kamera Nikon F90X	Fa. Nikon GmbH (Düsseldorf, D)
Lamin Air (HB 244 8)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Light Cycler	Fa. Roche (Mannheim, D)
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena, D)
MiniMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Photokammer	Fa. Kodak (Rochester, USA)
Power Pac 200 Spannungsgerät	Fa. Biorad (München, D)
Thermocycler Modell T3	Fa. Biometra (Göttingen, D)
Thermocycler RoboCycler Gradient 40	Fa. Stratagene (Heidelberg, D)
Vortex VF2	Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge	Fa. Heraeus (München, D)

1.2 Chemikalien

Aqua ad injectabile	Fa. Braun (Melsungen, D)
Brefeldin A	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
5-[und 6-]-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE)	Fa. Molecular Probes (Eugene, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Fluo-3/AM(Acetoxymethylester)	Fa. Molecular Probes (Eugene, USA)
Formaldehyd	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Fura Red/AM (Acetoxymethylester)	Fa. Molecular Probes (Eugene, USA)
Geneticin g-418 Sulfat	Fa. GibcoBRL (Paisley, Schottland)
Heparin-Natrium 25000 I.E./ 5 ml	Fa. Ratiopharm (Ulm, D)
NaCl 0,9% (Kochsalzlösung)	Fa. Baxter (Unterschleißheim, D)
PharmLyse-Reagenz	Fa. BD Pharmingen (San Diego, USA)
Phorbol Myristat Acetat (PMA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Pluronic F-127 (20 % Lsg. in DMSO)	Fa. Molecular Probes (Eugene, USA)

To-Pro-3 Iodid (TOPRO-3)	Fa. Molecular Probes (Leiden, NL)
Tris	Fa. Bio-Rad (Marnes la Moquette, F)
Tris-Borat-EDTA (TBE)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

1.3 Materialien für die Zellkultur

Agar	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Biocoll Separationsmedium (Ficoll)	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Fötale Kälberserum (FCS)	Fa. Invitrogen (Carlsbad, USA)
Hefeextrakt	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Humanes AB-Serum (HS)	Fa. BioWhittaker (Wakersville, USA)
Humanes Serum Albumin (HSA)	Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D)
IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Medium)	Fa. PAA (Linz, A)
Interleukin-3 (IL-3)	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	Fa. PAA (Linz, A)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)-1640-Medium	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Soc-Medium	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen, D), Falcon (Heidelberg, D), Bibby Sterrillin (Stone, GB) und Corning (Corning NY, USA) bezogen. Für Migrationsassays wurden zusätzlich spezielle 24-Wellplatten mit eingesetzten Filtern (sog. Trans-well-Platten) verwendet (Corning NY, USA).

1.4 Zellkulturmedien und Puffer

<u>RPMI-Vollmedium:</u>	<u>Erythrozyten-Lysepuffer:</u>
RPMI 1640-Medium	PBS
10 Vol % FCS	PharmLyse-Reagenz
1,5 mM L-Glutamin	
100 IU/ ml Penicillin	<u>MACS-Puffer:</u>
100 µg/ ml Streptomycin	PBS
	2 mM EDTA
<u>DMEM-Selektionsmedium für CD40L-Zellen:</u>	0,5 Vol % BSA
DMEM-Medium	pH 7,2
5 Vol % FCS	
2 mM Glutamin	<u>TE-Puffer:</u>
100 IU/ml Penicillin	Wasser
100 µg/ml Streptomycin	10 mM Tris Chlorid
200 µg/ml Geneticin G-418 Sulfat	1 mM EDTA
	pH 8,0

1.5 Reagenziensätze

Zellisolation mittels der MACS-Methode:

B Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
BDCA-1 Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
BDCA-2 Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
BDCA-4 Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD45RO MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD8 ⁺ MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
IFN γ Secretion Assay	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Monocyte Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Pan T Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

RNA Isolation, reverse Transkription und PCR:

First-Strand cDNA Synthesis Kit	Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D)
High Pure RNA Isolation Kit	Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D)
LightCycler FastStart DNA Sybr Green I	Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D)

PCR-Primer für Adenosin-Rezeptoren:

A ₁ -Rezeptor	TCCCCCTCGCCATCCTCATCAACA GGCCCGCTCCACCGCACTCAG
A _{2a} -Rezeptor	CTGGTCCTCACGCAGAGCT ACTCGCGGATACGGTAGGC
A _{2b} -Rezeptor	CGCCCACCAACTACTTC GCCACCAGGAAGATCT
A ₃ -Rezeptor	GCTTACCGTCAGATACAAG GCATAGACGATAGGGTTCA

Alle Primer wurden von der Fa. Sigma Genosys (Castle Hill, Australia) synthetisiert.

Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA:

Human IFN- α ELISA	Fa. Bender MedSystems (Wien, A)
Human IL-12 ELISA	Fa. Bender MedSystems (Wien, A)
Humaner Opteia IL-6 ELISA	Fa. BD Pharmingen (San Diego, USA)
Humaner Opteia IL-12 p40 ELISA Kit	Fa. BD Pharmingen (San Diego, USA)
Humaner Opteia IL-12 p70 ELISA Kit	Fa. BD Pharmingen (San Diego, USA)
Humaner Opteia TNF- α ELISA Kit	Fa. BD Pharmingen (San Diego, USA)

Zellfixierung und -permeabilisierung:

Fix N Perm Kit	Fa. An der Grub (Kaumberg, A)
----------------	-------------------------------

1.6 Zytokine, Chemokine und Wachstumsstimulatoren

Anti-Interleukin-4	Fa. BD Pharmingen (San Diego, USA)
Anti-Interleukin-12	Fa. BD Pharmingen (San Diego, USA)
Calcium-Ionomycin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
CD3/ CD28-Dynabeads	Fa. Dynal/ Invitrogen (Carlsbad, USA)
<u>Chemokine:</u> IP-10, MIG, MIP-3 β , Rantes	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
SDF-1	Fa. Dictagene (Genf, CH)
GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interferon- β	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)

Interferon- α 2aFa. PBL Biomedical Laboratories
(New Brunswick, USA)

Interleukin-2, -3, -4, -7, -12, -15

Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)

Lipopolysaccharid (LPS)

(Herkunft: Salmonella typhimurium)

Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)

Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Phytohämagglutinin (PHA)

Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

TNF-alpha

Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)

1.7 FACS-Antikörper

Name	Spezifität	Klon	Isotyp	Fluoreszenz	Hersteller
Anti-CD3	CD3	SK7	Maus IgG ₁	FITC, PerCP	BD PharMingen
Anti-CD4	CD4	RPA-T4		PE, APC	BD PharMingen
Anti-CD8	CD8	RPA-T8		FITC, APC	BD PharMingen
Anti-CD14	CD14	M5E2		APC	BD PharMingen
Anti-CD19	CD19			APC, PE	BD PharMingen
Anti-CD45RA	CD45RA	L48	Maus IgG ₁	FITC	BD PharMingen
Anti-CD45RO	CD45RO		Maus IgG ₁	PE	BD PharMingen
Anti-CD40	CD40	FC3	Maus IgG ₁	FITC	BD PharMingen
Anti-CD80	CD80	BB1	Maus IgG ₁	FITC	BD PharMingen
Anti-CD83	CD83			PE	BD PharMingen
Anti-CD86	CD86	2331	Maus IgG ₁	APC, PerCP	BD PharMingen
Anti-CD123	CD123			PE	BD PharMingen
Anti-CD154	CD154 (CD40L)	TRAP1	Maus IgG ₁	FITC	BD PharMingen
Anti-Lin1	CD3,14,16,19,20,56			FITC	BD PharMingen
Anti-BDCA-2	BDCA-2	AC144	Maus IgG ₁	PE, FITC	Miltenyi Biotec
Anti-HLA-DR	HLA-DR	L243	Maus IgG _{2a}	PerCP	BD PharMingen
Anti-IFN- γ	IFN- γ	4SB3	Maus IgG ₁	PE	BD PharMingen
Anti-Interleukin 4	Interleukin 4	8D4-8	Maus IgG ₁	PE	BD PharMingen
Streptavidin-APC	Streptavidin			APC	BD PharMingen
Anti-MCP-1	MCP-1			PE	R&D Systems
Anti-MIP-1 α	MIP-1 α			PE	R&D Systems
Anti-IP-10	IP-10			PE	R&D Systems
Anti-Rantes	Rantes			PE	R&D Systems

Tab. 7: Monoklonale FACS-Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle und Zytokine

1.8 Oligodesoxynukleotide

Komplett oder teilweise Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide wurden freundlicherweise von der Fa. Coley Pharmaceutical Group (Wellesley MA, USA) zur Verfügung gestellt und waren vorab negativ für Endotoxin getestet (< 0,03 EU/ml, LAL-Assay, Fa. BioWhittaker, Wakersville MD, USA). Falls nicht anders angegeben, werden sie in einer Konzentration von 3 µg/ml eingesetzt. Eine Übersicht gibt Tabelle 8.

Name	Typ	Länge	Nukleotid-Sequenz (5' → 3')
ODN 2006	CpG-B	24-mer	t cg t cg ttt tgt cgt ttt gtc gtt
ODN 2216	CpG-A	19-mer	ggG GGA CGA TCG TC g ggg gG

Tab. 8: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide:

Kleinbuchstabe: Phosphothioat-Bindung; Großbuchstabe: Phosphodiester-Bindung am 3' Ende der Base; fett gedruckt: CpG-Dinukleotide

2 Zellisolation und Kultur

2.1 Aufreinigung von peripheren mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = *Peripheral blood mononuclear cells*) wurden entweder aus 200 ml heparinisiertem Vollblut gesunder Spender (pro 10 ml Blut 100 µl Heparin-Natrium) oder aus *Buffy coats* gewonnen, die freundlicherweise vom Krankenhaus Harlaching (Eigenblutspender, HIV- und Hepatitis-negativ) zur Verfügung gestellt wurden. Als *Buffy coat* wird die Leukozytenmanschette bezeichnet, die man beim Abzentrifugieren von Vollblut erhält; sie besteht aus den plasmafreien zellulären Bestandteilen des Blutes mit einem reduzierten Gehalt an Erythrozyten.

Die Isolation der PBMCs erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Hypaque-Lösung. Hierzu wird das Blut (Vollblut bzw. *Buffy coats*) auf drei bzw. sechs Falcon 50 ml-Röhrchen (*Blue caps*) verteilt, die mit 0,9 % sterilem NaCl aufgefüllt werden. Dieses verdünnte Blut wird nun vorsichtig auf vier bzw. acht Röhrchen à 50 ml geschichtet, die vorher mit je 15 ml Ficoll-Hypaque gefüllt wurden, ohne dabei die Phasen zu vermischen. Nach der ersten Zentrifugation (Beschleunigung/ Bremsung: 1/1, 1000 g, 20 min, 20 °C) erhält man in jedem *Blue cap* von oben nach unten folgende Schichtung: Plasma, Lymphozytenmanschette aus PBMCs, Ficoll und andere Zellen (Erythrozyten, Granulozyten). Der PBMC-Ring wird vorsichtig abpipettiert, in ein neues *Blue cap* gegeben, mit steriler physiologischer Kochsalzlösung auf 50 ml

aufgefüllt und zwei weitere Male zentrifugiert (9/4, 520 g, 10 min, 20 °C und 9/4, 400 g, 7 min, 4 °C). Vor dem letzten Waschschrift (9/4, 400 g, 7 min, 4 °C) wird das Zellpellet in 7 ml Erythrozyten-Lysepuffer, einer hypotonen Pufferlösung, resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren.

Zuletzt wird das Zellpellet in dem gewünschten Kulturmedium aufgenommen. Zur Zellzahlbestimmung wird ein Aliquot mit Trypanblau angefärbt (Verdünnung 1:20) und mit Hilfe einer Neubauer-Kammer unter dem Mikroskop gezählt. Die Vitalitätsbestimmung der mononukleären Zellfraktion (in der Regel > 95 %) erfolgt dabei mittels Trypanblauausschlusstest. Die intakte Zellmembran lebender Zellen verhindert die Aufnahme dieses Supravitalfarbstoffes. Tote Zellen werden hingegen blau angefärbt.

2.2 Magnetische Zellsortierung zur PDC-Gewinnung

Die Isolation der PDCs (plasmazytoide dendritische Zellen) aus den gewonnenen PBMCs erfolgte mittels magnetischer Zellseparation (MACS = *magnetic-activated cell sorting*) mit BDCA-4-Kit. BDCA-4 ist ein Oberflächenmolekül, das vor allem auf plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert wird.

Bei der MACS-Isolationmethode werden Zellen mit speziellen Antikörpern markiert. Diese Antikörper sind wiederum an paramagnetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt. Zusätzlich wird ein FC-Rezeptor-blockierendes Agens hinzu gegeben, um unspezifische Bindungen des Antikörpers an FC-Rezeptoren zu verhindern. Die Zellen werden für 15 Minuten in einem speziellen MACS-Puffer bei 4 °C mit den *Microbeads* markiert, gewaschen und anschließend in MACS-Puffer resuspendiert.

Die markierte Zellsuspension wird auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält. Die Säule wird in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten eingebracht, das alle mit *Microbeads* beladenen Zellen in der Matrix zurückhält. Alle unmarkierten Zellen werden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule zurückgehalten wird. Anschließend wird die markierte Zellpopulation außerhalb des Magnetfelds aus der Säule eluiert und die markierte wie auch die unmarkierte Zellfraktion in Kultur genommen. Das MACS-System kann folglich zur Anreicherung (positive Selektion) wie auch zum Ausschluss einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden.

Zur Aufreinigung nach der MACS-Methode wurden in dieser Arbeit ausschließlich Reagenziensätze der Firma Miltenyi Biotec gemäß dem Hersteller-Protokoll verwendet.

Neben PDCs wurden auch MDCs (myeloide dendritische Zellen, CD1c⁺), B-Zellen sowie T-Zellen (CD8⁺ und CD4⁺ CD45RA⁺) gewonnen. Alle Experimente und Isolationsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt.

2.3 Kultur plasmazytoider dendritischer Zellen

Die isolierten plasmazytoiden dendritischen Zellen wurden in einer Konzentration von 250 000 Zellen/ml (Endvolumen 200 µl pro Well) in 96-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Dies erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und in einer 5 %-igen CO₂-Atmosphäre in der Luft. Als Kulturmedium wurde Vollmedium verwendet und 10 ng/ml IL-3 (= Negativkontrolle) zugesetzt, um das Überleben der Zellen zu gewährleisten. Zur Stimulation gab man den jeweiligen Wells zusätzlich CpG-ODN 2006 bzw. 2216 in einer Konzentration von 3 µg/ml hinzu. Nach 48 Stunden wurde der zellfreie Überstand für Migrationsassays (siehe Kapitel 5) oder zur Detektion von Zytokinkonzentrationen abgenommen.

2.4 Generierung von Th1- und Th2-Zellen

Durch magnetische Zellseparation erfolgt in zwei aufeinander folgenden Zellseparationen die Gewinnung naiver (= CD45RA⁺) CD4⁺ T-Zellen. In einem ersten Isolationsschritt werden CD4⁺ T-Zellen per Depletion von der Gesamtzellpopulation separiert, indem CD4⁺ Zellen mit einem Biotin-Antikörper-Cocktail, bestehend aus Antikörpern gegen CD8, -14, -16, -19, -36, -56, -123, TCRγ/δ und Glycophorin A, markiert werden. Die Negativselektion entspricht allen CD4⁺ T-Zellen. Diese werden in einem zweiten Isolationsschritt mit CD45RO *Microbeads* markiert. Nach erneuter Negativselektion erhält man naive (= CD45RA⁺) CD4⁺ T-Zellen (Reinheit zwischen 80 und 90 %), die in Kulturmedium aufgenommen und in einer Konzentration von 2 Mio/ml in 24-Wellplatten mit 10 U/ml IL-2 und 1,25 µl/ml CD3/ CD28-Dynabeads inkubiert werden.

Um die Differenzierung in Richtung Th1-Zellen zu fördern, werden den Kulturen 5 ng/ml IL-12 und 1 µg/ml anti-IL-4, für eine Differenzierung in Th2-Richtung 1000 U/ml IL-4 und 3 µg/ml anti-IL-12 zugesetzt. Die Inkubation findet bei 37 °C im Brutschrank über einen Zeitraum von 7 Tagen statt; bereits nach 5 Tagen wird ein Mediumwechsel sowie eine erneute Gabe von IL-2 vorgenommen. Zur Kontrolle des Differenzierungserfolgs wird ein Aliquot der Kulturen mit Ionomycin (in einer Konzentration von

500 ng/ml) und PMA (Phorbol Myristat Acetat; in einer Konzentration von 50 ng/ml) in der Anwesenheit von Brefeldin A (1 µg/ml) zur Verhinderung der Zytokinfreisetzung stimuliert. Nach 4 Stunden wurde dann durchflusszytometrisch (siehe Abschnitt 4) die intrazelluläre IFN-γ- (charakteristisch für Th1-Zellen) und IL-4-Produktion (charakteristisch für Th2-Zellen) in beiden Zellpopulationen bestimmt.

2.5 Bestrahlung von Stimulatorzellen

In einigen Versuchen wurden CD40 Ligand-transfizierte Fibroblasten (*baby hamster kidney cells* = BHK-Zellen) zur Stimulation von PDCs mit CD40L eingesetzt. Die Zellen hat Herr Dr. Engelmann (LMU München) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Um eine Proliferation der BHK-Zellen im Versuchsansatz während der Kultur zu verhindern, wurden sie in 5-10 ml Medium suspendiert und in einer Röntgenbestrahlungsanlage (Institut für Immunologie, LMU München) mit 30 Gray bestrahlt. Die CD40L-Zellen wurden den plasmazytoiden dendritischen Zellen in einem Verhältnis von 1:10 hinzugesetzt.

3 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Die Quantifizierung verschiedener Proteine wie der Zytokine IFN-α, TNF-α (Tumor Nekrose Faktor α) und der Interleukine IL-6, IL-12p40 und IL-12p70 erfolgte mittels ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay* = enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) im zellfreien Überstand. Die ELISAs wurden entsprechend der Herstellerangaben der jeweils verwendeten ELISA-Kits durchgeführt und mit dem ELISA-Reader spektrometrisch bestimmt.

Das Testprinzip des ELISAs beruht auf der Bindung gelöster Zytokine aus Zellüberständen an Protein-spezifischen Antikörpern. Entweder sind die Platten bereits mit dem besagten Antikörper (*coating antibody*) beschichtet oder sie werden über Nacht selbst beschichtet. Neben einer Standardreihe mit bekannter Proteinmenge werden nun alle Proben in Wells pipettiert, die mit einem Protein-spezifischen Antikörper beschichtet sind. Während der zweistündigen Inkubationszeit bindet das vorhandene Protein an die Antikörper. Nach mehreren Waschschritten wird ein zweiter, biotinylierter Antikörper (*detection antibody*) zugegeben, der das bereits gebundene Protein an einem anderen Epitop bindet. Zusätzlich fügt man ein Strept-avidin-Peroxidase-Konjugat hinzu, das wiederum an Biotin bindet. Durch die

Verwendung mehrerer Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper wird eine Signalverstärkung und somit eine höhere Sensitivität erreicht. Nach Entfernen des ungebundenen Konjugates durch einen weiteren Waschschrift wird die Substratlösung hinzu gegeben und durch das gebundene Enzym zu Farbstoff umgesetzt. Die Farbtintensität, die proportional zur Proteinkonzentration der Probe ist, wird mittels Absorptions-ELISA-Reader eingelesen. Mit Hilfe der Standardreihe kann die genaue Konzentration in der Probe ermittelt werden.

Zur Konzentrationsbestimmung von IL-12p40, IL-12p70 und IL-6 wurden ELISA-Kits zum Selbstbeschichten verwendet. Bei diesen Kits werden zunächst die Wände der Vertiefungen von 96-Wellplatten über Nacht mit Antikörpern gegen das zu messende Zytokin beschichtet. Zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen wird die Platte am nächsten Tag mit einem Blockierungsreagenz (fötales Kälberserum) geblockt, bevor die Proben und die Standardkurve in die Vertiefungen pipettiert werden. Im Unterschied zu den fertigen ELISAs fügt man bei den Kits zum Selbstbeschichten die Biotin-konjugierten Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin zeitgleich mit dem Streptavidin hinzu. Die Zugabe des Farbstoffes und die Auswertung am ELISA-Reader erfolgt auf die gleiche Art und Weise.

4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

4.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie (FACS = *Fluorescence-activated cell sorting*) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand ihres Phänotyps mittels Streulicht- und Fluoreszenzsignalen zu analysieren und zu quantifizieren, indem die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein entsprechendes Oberflächenantigen oder ein intrazelluläres Molekül markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom nacheinander einzeln durch einen Laserstrahl geführt werden. Die durchfluss-zytometrischen Analysen erfolgten mit einem FACSCalibur-Gerät und den dazu gehörigen Spülflüssigkeiten. In diesem FACS-Gerät sind zwei Laserstrahler integriert, die monochromatisches Licht emittieren: der Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und der Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 635 nm.

Verschiedene Zelleigenschaften wie Größe, Granularität, Form und Membranoberfläche führen zu einer Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht = *forward scatter* (FSC)) und einer rechtwinklig dazu

angebrachten (Seitwärtsstreulicht = *sideward scatter* (SSC)) gesammelt und photometrisch detektiert wird. Die Intensität des FSC wird hauptsächlich durch die Zellgröße, die des SSC durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Die gewünschte Zellpopulation wird anhand dieser Kriterien ausgewählt und weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht.

Der Laserstrahl regt das Chromophor der für die Markierung von Oberflächenproteinen oder intrazellulären Molekülen verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten an, die durch eine Linse gesammelt werden. Bandpassfilter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. Somit können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit auch zur Anzahl der untersuchten Moleküle. Die verwendeten Fluorochrome sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Fluoreszenzfarbstoff	Bandpassfilter	Exzitation	Emission
Fluoresceinisothiocyanat (= FITC)	530 nm	494 nm	518 nm
Phycoerythrin (= PE)	585 nm	565 nm	575 nm
Allophycocyanin (= APC)	661 nm	650 nm	660 nm
Peridinin Chlorophyll Protein (= PerCP)	670 nm	488 nm	675 nm

Tab. 9: Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit den jeweiligen Bandpassfiltern und den dazugehörigen maximalen Emissions- und Exzitations-Wellenlängen

Bei der direkten Immunfluoreszenz werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, die direkt an die entsprechenden Moleküle binden. Bei dem Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz werden die Zellen in einem ersten Schritt mit einem unmarkierten Antikörper inkubiert und erst in einem zweiten Schritt mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gefärbt, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist.

Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überlappen. Dieses Überlappen wird durch Kompensation korrigiert, indem von jedem registrierten Fluoreszenzsignal der Anteil abgezogen wird, der durch das Überlappen entsteht. Hierzu werden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, bei denen jeweils nur eine Eigenschaft mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt ist, während die anderen Fluorochrome, gebunden an geeignete Isotypen-Antikörper, als Negativkontrolle dienen. Dabei wird sichtbar, wie stark ein bestimmtes Fluorochrom in die

anderen Kanäle hineinstrahlt und so die Kompensation ermöglicht. In gleicher Weise kann mit Hilfe der Isotypen die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so justiert werden, dass sich Zellen mit entsprechenden Antigenen bzw. Eigenschaften qualitativ und quantitativ unterscheiden und vergleichen lassen.

4.2 Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Für FACS-Analysen wurden $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ Zellen in FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen im rücklaufenden Tropfen resuspendiert. Zur Färbung werden die Zellen 15 Minuten bei 4°C unter Lichtausschluss mit FITC, PE, PerCP oder APC gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) bzw. einem unmarkierten Antikörper (indirekte Fluoreszenz) inkubiert und anschließend mit PBS einmal gewaschen. Bei indirekter Fluoreszenz wird dann der Inkubationsschritt wiederholt, diesmal mit einem fluoreszenzgekoppelten Isotyp-spezifischen Antikörper. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde auf einem FACSCalibur gemessen und im Anschluss daran mit Hilfe der Cell Quest Software 4.0 (Pharmingen/ Becton Dickinson, Heidelberg, D) analysiert.

Die Reinheitsbestimmung der frisch isolierten Zellpopulationen wurde ebenfalls auf diese Weise ermittelt. Plasmazytoide dendritische Zellen sind als Lineage-Cocktail-1(Lin1)-negative sowie als CD123-, HLA-DR (*Human leukocyte antigen DR* = MHC-II)- und BDCA-2-positive Zellen definiert und lassen sich somit deutlich von den übrigen mononukleären Zellen abgrenzen. Der Lineage-Cocktail-1 besteht aus einer Mischung von CD3-, CD14-, CD16-, CD19-, CD20- und CD56-Antikörpern. Die Reinheit lag je nach Spender zwischen 80 und 96 %. Abbildung 9 zeigt beispielhaft die Reinheit eines PDC-Spenders, die durchflusszytometrisch ermittelt wurde.

Die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen FACS-Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle und Zytokine zur Bestimmung der Reinheit der einzelnen Zellpopulationen sind in Tabelle 7 aufgelistet.

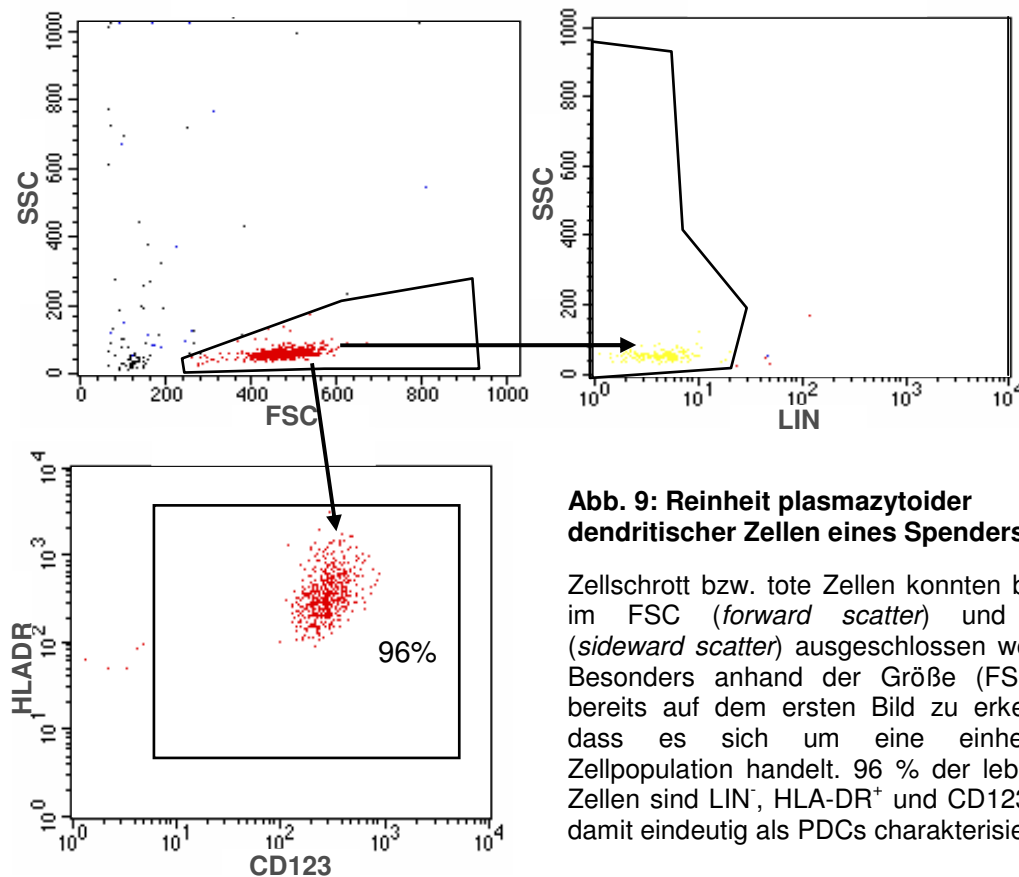


Abb. 9: Reinheit plasmazytoider dendritischer Zellen eines Spenders:

Zellschrott bzw. tote Zellen konnten bereits im FSC (*forward scatter*) und SSC (*sideward scatter*) ausgeschlossen werden. Besonders anhand der Größe (FSC) ist bereits auf dem ersten Bild zu erkennen, dass es sich um eine einheitliche Zellpopulation handelt. 96 % der lebenden Zellen sind LIN⁻, HLA-DR⁺ und CD123⁺ und damit eindeutig als PDCs charakterisiert.

4.3 Zellzahlbestimmung mit dem Durchflussszytometer

Mit Hilfe der Durchflussszytometrie kann neben der qualitativen auch eine quantitative Analyse erfolgen. Für diesen Vorgang werden die Zellen, deren Anzahl unbekannt ist, in einem definierten Volumen aufgenommen. Innerhalb einer vorher festgelegten Zeitdauer wird vom FACS-Gerät ein bestimmtes Volumen eingesaugt und die darin erhaltene Zellzahl ermittelt. Anhand des Ausgangsvolumens erfolgt daraufhin die Hochrechnung auf die gesamte Zellzahl.

4.4 Darstellung intrazellulärer Chemokine in PDCs

Zur Messung intrazellulärer Chemokine wurden die frisch isolierten plasmazytoiden dendritischen Zellen über Nacht für 12 bzw. 18 Stunden je nach Bedingung mit IL-3 und Oligonukleotiden kultiviert, bevor den Kulturen Brefeldin A in einer Konzentration von 1 µg/ml für die Dauer von 10 bzw. 4 Stunden zugesetzt wurde. Brefeldin A inhibiert die Chemokinsekretion während der Stimulationsphase und hat sich im Vergleich zu Monensin in Bezug auf das Überleben der Zellen als leicht vorteilhaft erwiesen

(Schuerwegh 2001). Die Gesamtzeit des Versuchsansatzes betrug somit immer 22 Stunden. Nach Anfärben der Oberflächenantigene und einem Waschschrift wurden die Zellen entsprechend des Herstellerprotokolls mit dem Fix & Perm-Kit behandelt. Durch die Fixierung werden intrazelluläre Reaktionen gestoppt und die Zellen in ihrem momentanen Zustand „konserviert“. Durch die Permeabilisation wird die Zellmembran für Antikörper durchlässig, so dass intrazelluläre Moleküle angefärbt werden. Nach dem ersten Schritt der Fixierung (15 Minuten bei Raumtemperatur und zweimaligem Waschen mit PBS) wird in einem zweiten Schritt zeitgleich die Permeabilisierung und Anfärbung der intrazellulären Bestandteile vorgenommen. Da die verwendeten Chemokin-Antikörper (je 2 µl) in denselben Kanal strahlen, wurden sie einzeln in gesonderten Proben angefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer entsprechend der Bestimmung von Oberflächenmolekülen.

5 Chemotaxis-Assay

Das Wanderungsverhalten von plasmazytoiden dendritischen Zellen wie auch von anderen Zellpopulationen auf unterschiedliche Stimuli hin wurde mittels Zellmigrations-Assays untersucht. Dazu wurden 24-Wellplatten mit eingesetzten Filtern (sog. Transwell-Platten) verwendet. Die Porengröße des Filters betrug 5 µm.

Die frisch isolierten PDCs ruhen zunächst ein bis zwei Stunden (*ex vivo*) oder werden über Nacht mit 10 ng/ml IL-3 in Kultur gegeben. Am darauf folgenden Tag wird zunächst 600 µl RPMI-Medium mit 2 % HS oder 2 % FCS sowie die gewünschten Stimulanzen in die untere Kammer der 24-Wellplatten pipettiert. PDC- oder MDC-Überstände werden 20%-ig eingesetzt, entsprechend 120 µl Überstand und 480 µl Medium. Dann wird in jedes Well ein Filter eingesetzt und die plasmazytoiden dendritischen Zellen in einer Konzentration von 250 000/ml sowie in einem Endvolumen von 100 µl in demselben Medium (ohne Stimulationszusätze) in die obere Kammer hinzu gegeben. Die Inkubation bei 37 °C beträgt zwei Stunden. Danach entnimmt man das Medium mit den gewanderten Zellen aus den Wellplatten, gibt es in FACS-Röhrchen und bestimmt qualitativ und quantitativ die gewanderten Zellen (siehe Kapitel 4.2 und 4.3).

Folgende chemotaktische Stimuli wurden eingesetzt:

- rekombinante Zusatzstoffe
- zellfreie, zum Teil stimulierte Überstände von Zellkulturen
- verschiedene aufgereinigte Zellpopulationen

Eine Versuchsskizze ist in Abbildung 10 dargestellt. Alle Versuchsbedingungen wurden in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Im Einzelnen wird dies explizit im Ergebnisteil aufgeführt.

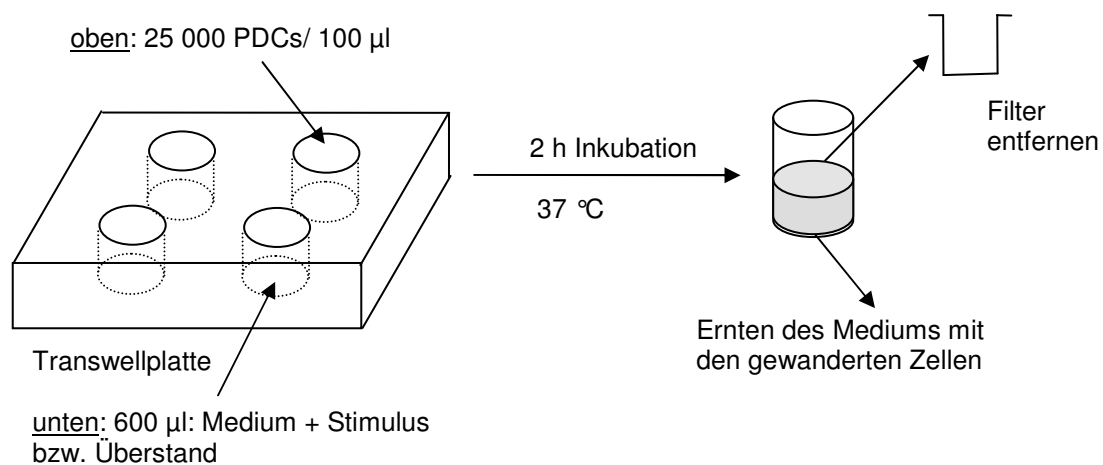


Abb. 10: Versuchsskizze des Chemotaxis-Assay

Um in Experimenten die chemotaktische Wirkung einer Zellpopulation auf andere Zellen derselben Population untersuchen zu können, wurde im entsprechenden Chemotaxis-Assay die wandernde Zellpopulation mittels des Farbstoffes 5-(6-) Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE) angefärbt, um sie von den bereits als Produzenten der chemotaktischen Stimuli im unteren Transwell-kompartiment befindlichen Zellen unterscheiden zu können.

CFSE bindet spontan und irreversibel sowohl an intrazelluläre als auch an oberflächliche Moleküle, wird bei Zellteilungen gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben und gibt nach Anregung bei 488 nm ein Licht der Wellenlänge 517 nm ab. Um die Färbereaktion zu stoppen und extrazellulär verbliebenes CFSE zu blocken, wird es durch Zugabe von FCS zum Medium abgefangen.

Zur Färbung wurden die Zellen in 400 µl NaCl und 1 µM CFSE aufgenommen und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert und dann zweimal mit kaltem RPMI-Medium mit 10 % FCS gewaschen.

In Abbildung 11 ist chronologisch der Versuchsplan eines Chemotaxis-Assays mit CFSE-gefärbten PDCs skizziert. Primär wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen PDCs aufgereinigt, am dritten Tag der Chemotaxis-Assay durchgeführt. Zu allererst wurden die im unteren Transwellkompartiment eingesetzten PDCs isoliert und für insgesamt 36 Stunden mit IL-3 (10 ng/ml) und Oligonukleotiden inkubiert. Die Vorinkubation der oben eingesetzten PDCs mit IL-3 betrug hingegen nur 18 Stunden. Mit diesen Vorlaufzeiten wurde eine verbesserte Migrationsfähigkeit der Zellen erzielt, da sie sich eine Zeit lang von dem Isolationsschritt erholen konnten. Am Versuchstag erfolgte schließlich unmittelbar vor dem Migrations-Assay die CFSE-Färbung.

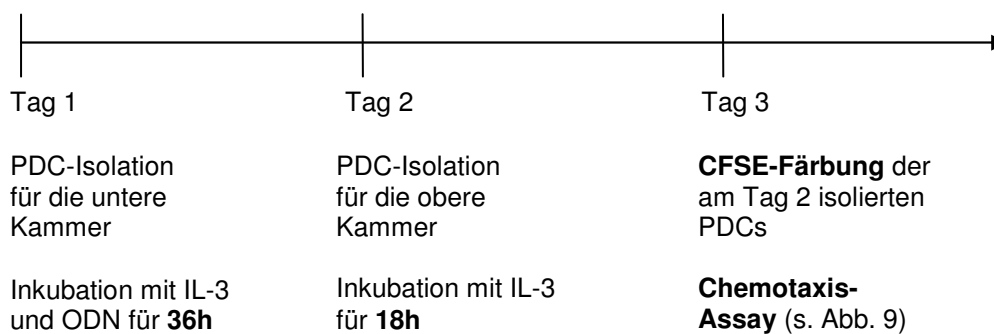


Abb. 11: Versuchsplan für den Chemotaxis-Assay mit CFSE-gefärbten PDCs

6 Intrazelluläre Kalziummessung

Durch die Bindung von Chemokinen an ihre Rezeptoren auf der Zellmembran von plasmazytoiden dendritischen Zellen wird eine Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt, an deren Ende die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern steht. Mit einer Methode zur Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann somit nach Zugabe eines Chemokins zu den PDCs das Vorhandensein und die Funktionsfähigkeit von Chemokinrezeptoren auf deren Oberfläche nachgewiesen werden. Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration werden mittels FACS-Messungen untersucht (Novak 1994).

Die Inkubation der frisch isolierten plasmazytoiden dendritischen Zellen (5×10^5 Zellen/ml) erfolgt mit den Ca^{2+} -sensitiven Reagenzien Fluo-3 in einer Konzentration

von 2 µg/ml und Fura Red in 10 µg/ml sowie mit dem 0,02 %-igen Detergenz Pluronic F-127 bei 37 °C für 40 Minuten. Nach einem Waschschrift (9/4, 500 g, 7 min, 4 °C) zur Entfernung des überflüssigen Farbstoffes werden die Zellen in Vollmedium resuspendiert und in FACS-Röhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Anschließend werden verschiedene Chemokine zur Aktivierung ihres Chemokinrezeptors zugegeben. Als Positivkontrolle dient Ionomycin in einer Konzentration von 2 µg/ml.

Um einen stabilen Ausgangswert zu erhalten, werden die Proben zunächst unstimuliert für 20 Sekunden gemessen und dann erst die Stimuli zugegeben. Mit einer Auflösung von 120 Millisekunden werden über weitere 100 Sekunden die Veränderungen der Fluoreszenzsignale aufgezeichnet. Induziert der Stimulus aus intra- oder extrazellulären Speichern die Kalziumkonzentration im Zytoplasma, ändert sich die Fluoreszenzintensität der verwendeten Fluorophore Fluo-3 (in Gegenwart von Ca^{2+} erhöhte Intensität) und Fura Red (in Gegenwart von Ca^{2+} erniedrigte Intensität). Zur Datenanalyse wird mit Hilfe der FloJo Software (Version 3.4, Tree Star, San Carlos, CA) der Quotient der Fluoreszenzsignale von Fluo-3 und Fura Red berechnet und gegen die Zeit aufgetragen.

7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Bestimmung der mRNA-Expression eines Genes erfolgte mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Zum Nachweis, ob und in welcher Menge ein bestimmtes Gen in einer Zelle abgelesen wird, werden die jeweiligen Zellen zunächst lysiert, ihre RNA isoliert und in cDNA (*copy*-DNA = komplementäre DNA) umgeschrieben. Dann wird ein spezifischer Abschnitt der gesuchten DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und anschließend quantifiziert. Im Folgenden wird zunächst die Gewinnung von cDNA für eine PCR beschrieben, anschließend auf das allgemeine Funktionsprinzip der PCR eingegangen.

7.1 RNA-Isolation und Reverse Transkription

Um über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden zu können, muss die RNA revers transkribiert und in einen cDNA-Einzelstrang umgeschrieben werden. Zur RNA-Isolation aus plasmazytoiden dendritischen Zellen fand der RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend des Herstellerprotokolls Verwendung. Die gewonnene

RNA konnte dann in cDNA (1st Strand-cDNA-Synthesis Kit for RT-PCR, Roche, Mannheim) revers transkribiert werden. Dazu wurden die RNA-Proben zusammen mit dem Reaktionsgemisch (*Master Mix*) zunächst für 10 Minuten bei 25 °C, danach für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Der Master Mix besteht aus Reaktionspuffer, 25 mM MgCl₂, einem Desoxynukleotid-Mix, Oligo-p(dT)₁₅-*Primer*, RNase-Inhibitor und AMV-Reverse Transkriptase. Im ersten Schritt binden die *Primer* an die RNA-Matrize, im zweiten wird die RNA in cDNA umgeschrieben. Danach erhitzt man das Reaktionsgemisch auf 95 °C und kühlt es dann auf 4 °C (jeweils für 5 Minuten) ab. Bei diesem Vorgang wird die AMV-Reverse Transkriptase denaturiert, um eine Interferenz mit der folgenden PCR auszuschließen. Die gewonnene cDNA wurde durch Zugabe von bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 µl gebracht und die gewonnene cDNA als Ausgangssubstanz für die PCR verwendet.

7.2 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) ist ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Die PCR ermöglicht es, ein spezifisches DNA-Stück aus einem komplexen Nukleinsäuregemisch (genomische DNA, Plasmid-DNA, cDNA) zu vervielfältigen. Diese spezifische, zu amplifizierende DNA-Matrize wird als *template* bezeichnet. Die Reaktion erfolgt mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und einem sequenzspezifischen Oligonukleotid-*Primer*-Paar, das den Enden des *templates* homolog ist.

Folgende drei Schritte werden nacheinander durchlaufen:

- 1) Denaturierung und bei doppelsträngiger DNA Aufschmelzen der beiden Stränge der DNA-Matrizen (Denaturierung)
- 2) Spezifische Hybridisierung der *Primer* an die homologe Zielsequenz auf der DNA (Anlagerung)
- 3) Von den *Primern* ausgehende DNA-Synthese (Elongation).

In den anschließenden Amplifikationsrunden dient das neu synthetisierte DNA-Fragment selbst als Matrize. Dadurch ist in mehreren aufeinander folgenden Zyklen ein exponentielles Anreichern einer beliebigen DNA-Sequenz möglich, die zwischen den beiden *Primern* liegt.

8 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte als Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *Standard error of mean*) dargestellt wird. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige gepaarte Student-t-Test angewandt. Statistische Signifikanz wurde bei Werten $p < 0,05$ (signifikant) und $p < 0,01$ (hochsignifikant) angenommen und ist durch Markierung mit * bzw. ** angezeigt. Alle statistischen Berechnungen sowie die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel (Microsoft Cooperation, CA, USA).

C Ergebnisse

Teil I: Chemokinexpression, Chemotaxis und chemotaktische Interaktion plasmazytoider dendritischer Zellen mit anderen Zellen

Der erste Teil der hier vorliegenden Arbeit widmete sich der genaueren funktionellen Charakterisierung chemotaktischer Eigenschaften von plasmazytoiden dendritischen Zellen nach Aktivierung durch das exogene Gefahrensignal CpG-DNA. Untersucht wurden die Produktion von Chemokinen in PDCs, ihr chemotaktisches Verhalten auf Chemokine und Chemokinkombinationen sowie diejenigen Zielzellen, die durch aktivierte PDCs chemotaktisch angezogen werden.

1 Chemokinexpression und Chemotaxis von PDCs nach Aktivierung durch CpG-ODN

1.1 Gesteigerte Expression von Chemokinen in stimulierten PDCs

Die Stimulation mit CpG-ODN löst - wie bereits beschrieben - in PDCs ein Aktivierungsmuster aus, vergleichbar einer Virusinfektion und führt somit zur Ausreifung der PDC. Im Gegensatz dazu zeigt die nicht-stimulierte Zelle den konstitutiven Zustand der Chemokinexpression. Zunächst wurde untersucht, welche Chemokine sich in CpG-stimulierten PDCs nachweisen lassen. Bei hoher Expression der korrespondierenden Rezeptoren auf PDCs waren dabei folgende Chemokine von besonderem Interesse (Penna 2002b): IP-10 (CXCL10), ein CXCR3-Ligand sowie Rantes (CCL5) und MIP-1 α , beide CCR1- und CCR5-Liganden.

Frisch isolierte plasmazytoide dendritische Zellen (1 Mio/ml) wurden über Nacht für 12 Stunden in reinem Medium gehalten oder mit IL-3 (10 ng/ml) und CpG-Oligonukleotiden (ODN 2006 oder ODN 2216, je 3 μ g/ml) stimuliert. Nach Zugabe von Brefeldin A für die letzten 10 Stunden wurde die Produktion der Chemokine IP-10, MIP-1 α und Rantes nach intrazellulärer Färbung durchflusszytometrisch analysiert.

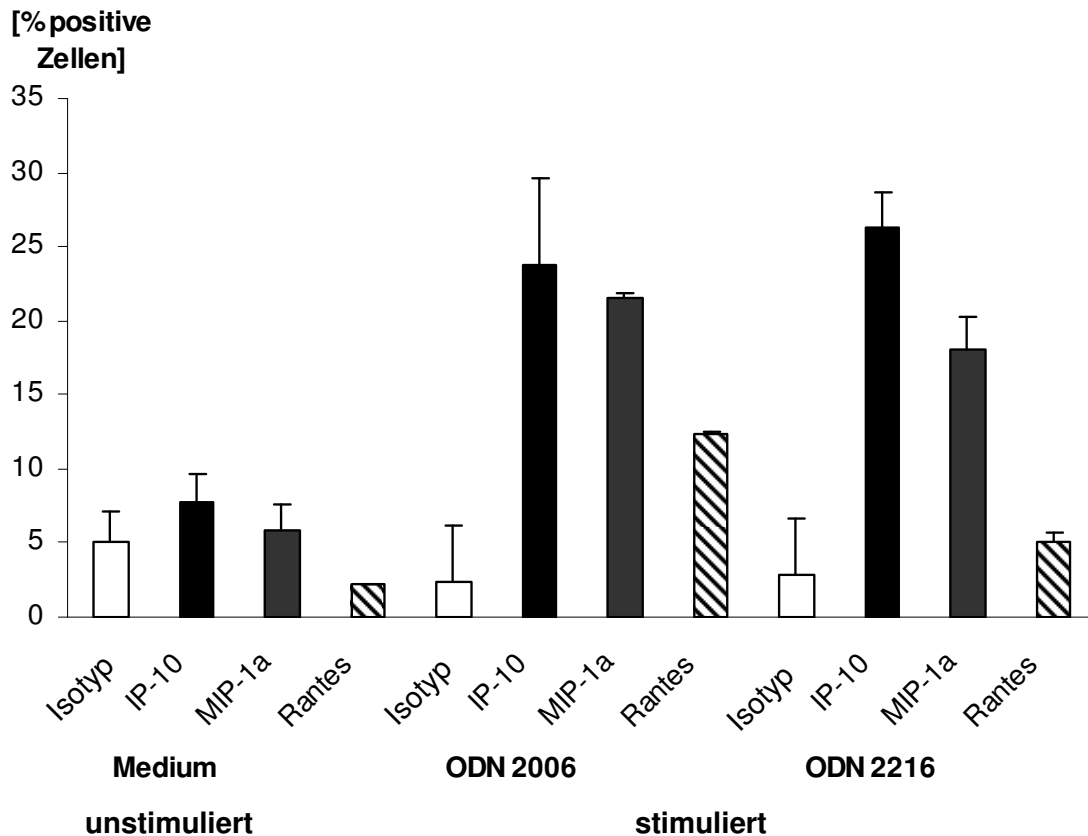


Abb.12: Intrazelluläre Chemokinexpression in PDCs

PDCs (1 Mio/ml) wurden in reinem Medium aufgenommen oder mit CpG-ODN (3 µg/ml) inkubiert. Nach insgesamt 22 Stunden konnte der Überstand abgenommen und die Zellen fixiert und permeabilisiert werden. Dabei wurde zugleich die Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern gegen die Chemokine IP-10, MIP-1α und Rantes sowie Isotypen vorgenommen und die Zellen im Durchflusszytometer untersucht. Dargestellt ist eines von drei repräsentativen Ergebnissen mit zwei Spendern. Die Ordinate gibt den Mittelwert der positiven Zellen in Prozent + SEM an.

Während in den unstimulierten Zellen kaum IP-10 oder MIP-1α nachweisbar war, kam es zu einer deutlichen Steigerung auf das Drei- bis Vierfache dieser beiden Chemokine in den CpG-ODN (sowohl 2006 als auch 2216) -stimulierten PDCs (siehe Abb. 12). Der CCR1-Ligand Rantes ließ sich hingegen nur in den ODN 2006-stimulierten PDCs auf knapp sechsfache Werte (von 2,16 auf 12,4% positive Zellen) hochregulieren. Parallel zur Chemokinproduktion wurde als Aktivierungsmerkmal auch die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf PDCs flowzytometrisch bestimmt; wie erwartet führte die Stimulation mit CpG-ODN zu einer deutlichen Aufregulation von CD86 mit einem stärkeren Effekt durch 2006 im Vergleich zu 2216 (Daten nicht gezeigt). Dies belegt, dass Oligonukleotide zur Stimulation und Reifung von plasmazytoiden dendritischen Zellen beitragen und es in reifen Zellen zu einer veränderten und vor allem stärkeren Chemokinproduktion kommt. Die vermehrte Expression inflammatorischer Chemokine nach Stimulation könnte weitere Zellen wie Monozyten und

Granulozyten, aber auch dendritische Zellen selbst, zum Ort der Infektion locken. Penna et al. beschrieb SDF-1, einen CXCR4-Liganden, als einen hochaktiven chemotaktischen Faktor für PDCs (Penna 2001). Eine Produktion von SDF-1 in CpG-stimulierten PDCs ließ sich jedoch weder flowzytometrisch durch intrazelluläre Färbung noch mittels ELISA durch Bestimmung im Überstand von PDCs nachweisen (Daten nicht gezeigt). Während SDF-1 in hoch-endothelialen Venolen im Lymphknoten exprimiert wird und im *steady state* eine wesentliche Rolle für die Einwanderung von PDCs in sekundäre lymphatische Organe spielt (Penna 2001 und 2002b), scheint die PDC selbst nicht in der Lage zu sein, dieses Chemokin zu produzieren.

1.2 Kalziumflux in PDCs nach SDF-1-Gabe und Migration zu SDF-1

Als nächstes interessierte die Frage, ob es zu einem Kalziumflux in plasmazytoiden dendritischen Zellen kommen würde, wenn man diese mit Chemokinen stimulierte. Die Expression verschiedener Chemokinrezeptoren auf PDCs wie CXCR3 und -4, CCR2, -5 und -7 hatte gezeigt werden können (Penna 2001; Vanbervliet 2003), unklar war jedoch ihre Funktionalität. Nach Bindung von Chemokinen an ihre Rezeptoren auf der Zellmembran steht am Ende der Signaltransduktionskaskade die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern. Dies weist auf die funktionelle Aktivität des jeweiligen Rezeptors hin.

SDF-1, IP-10 und MIG (CXCL9, neben IP-10 ein weiterer CXCR3-Ligand) wurden sowohl einzeln in aufsteigenden Konzentrationen als auch in Kombination miteinander auf ihre Fähigkeit getestet, Kalziumflux in PDCs auszulösen. Weitere Bedingungen waren die Vorinkubation mit einem der genannten Chemokine und Hinzugabe eines weiteren nach 10 bzw. 30 Minuten. Der Kalziumflux wurde dabei, wie im Abschnitt Material und Methoden angegeben, mit Hilfe Kalzium-sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe flowzytometrisch in aufgereinigten PDCs gemessen. Außer bei den Konzentrationsreihen wurde SDF-1 (Stromal-derived factor 1) in 100 ng/ml, IP-10 (IFN- γ -inducible protein of 10 kDa) und MIG (Monocyte IFN- γ -inducible protein) in 300 ng/ml eingesetzt.

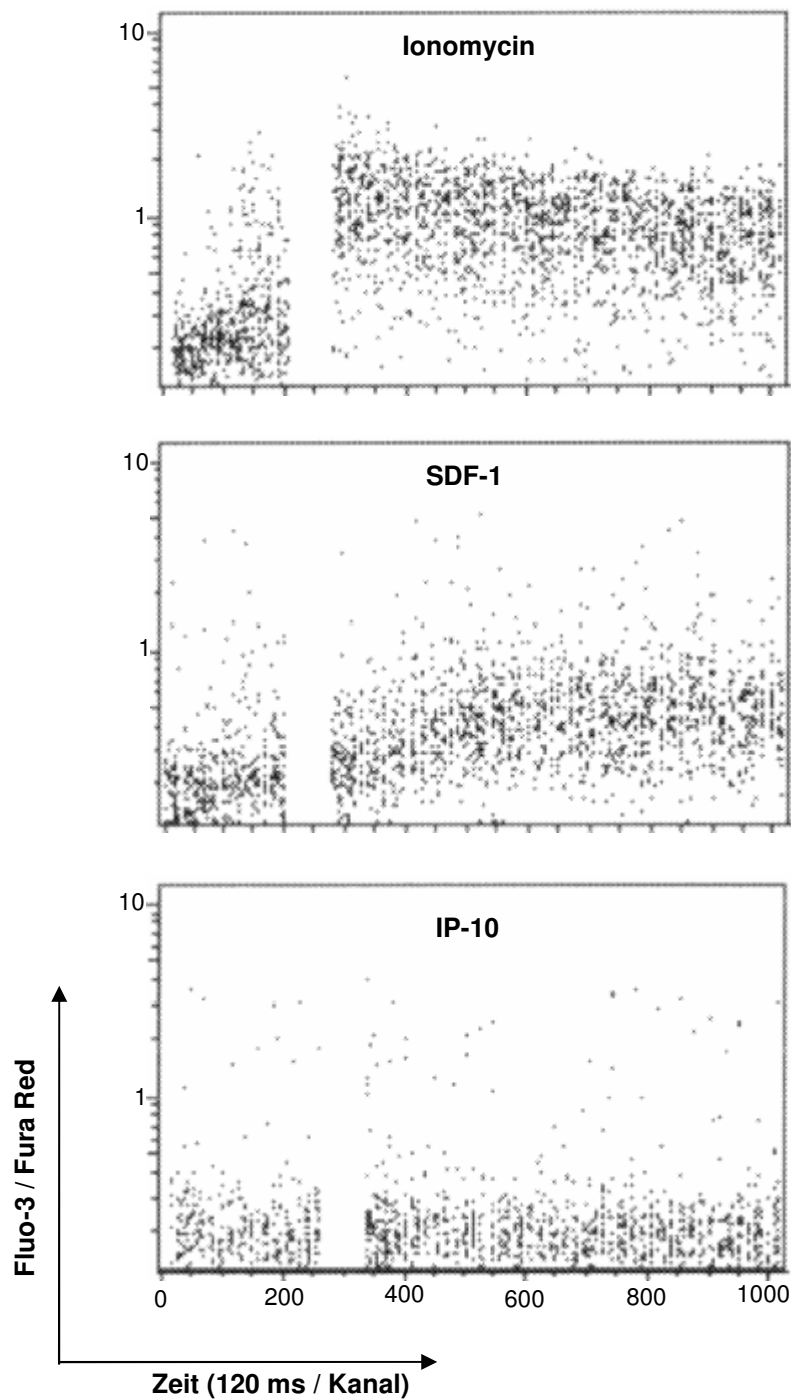


Abb. 13: Kalziumflux in PDCs nach SDF-1-Gabe

PDCs (5×10^5 /ml) wurden mit den Ca^{2+} -sensiblen Farbstoffen Fluo-3 (2 $\mu\text{g/ml}$) und Fura Red (10 $\mu\text{g/ml}$) bei 37 °C für 40 Minuten inkubiert. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wurde mittels Fluoreszenzzytometrie bestimmt. 20 Sekunden nach Beginn der Messung erfolgte die Stimulation mit SDF-1 (100 ng/ml), IP-10 (300 ng/ml) sowie Ionomycin (2 $\mu\text{g/ml}$) als Positivkontrolle. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzsignale des Fluo-3 / Fura Red-Quotienten über 120 Sekunden.

Wie in Abbildung 13 demonstriert, kam es nach SDF-1-Gabe zu einem Kalziumflux in PDCs. Nach Gabe von IP-10 ließ sich dies nicht zeigen. Als Positivkontrolle lief Ionomycin mit, das zu einem deutlichen Kalziumstrom führte. Alle anderen durchgeführten Bedingungen, wie höhere Konzentrationen der Chemokine (SDF-1 in 250 und 500 ng/ml, IP-10 und MIG in 500 ng/ml) oder die Koinkubation von SDF-1 plus CXCR3-Ligand konnten keine Veränderung in der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirken. Ebenso verhielt es sich bei Vorinkubation der Zellen mit einem Chemokin und späterer Zugabe (nach 10 und 30 Minuten) eines weiteren Chemokins (Daten nicht gezeigt).

Um die Wirkung des homöostatischen Chemokins SDF-1 auf plasmazytoide dendritische Zellen weiter zu charakterisieren, wurden im Anschluss an die Kalziumfluxmessung Chemotaxis-Assays durchgeführt. Dazu wurde in die unteren Kammern von Transwellplatten 600 µl Medium und SDF-1 in den Konzentrationen 50, 100 und 500 ng/ml pipettiert, im Anschluss daran jeweils $2,5 \times 10^4$ PDCs oben in die Filterkammern eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C. Danach konnten die gewanderten PDCs aus den unteren Kammern geerntet und die Zellzahl im Durchflusszytometer bestimmt werden. Während bei der Mediumkontrolle keine PDCs wanderten (eine einzige Zelle befindet sich in dem markierten Bereich), führt SDF-1 in einer Konzentration von 500 ng/ml zu einer gut sichtbaren Migration (73 Zellen gezählt), wie in Abbildung 14A gezeigt wird.

Um zu untersuchen, ob es sich bei dieser Beobachtung wirklich um einen SDF-1-spezifischen Effekt handelte, wurde das Migrationsverhalten der PDCs in Abhängigkeit von der SDF-1-Konzentration ermittelt. Bereits in einer Konzentration von 50 ng/ml bewirkt SDF-1, dass PDCs zu wandern beginnen (siehe Abb.14B). Die zweifache Konzentration (100 ng/ml) lockt fast doppelt so viele Zellen an (von 43 auf 82). Die höchste Konzentration von 500 ng/ml SDF-1 stellt wie erwartet nochmals einen deutlich stärkeren chemotaktischen Stimulus dar (183 Zellen). Damit lässt sich der beobachtete Effekt spezifisch auf SDF-1 zurückführen, da andere Faktoren konstant blieben.

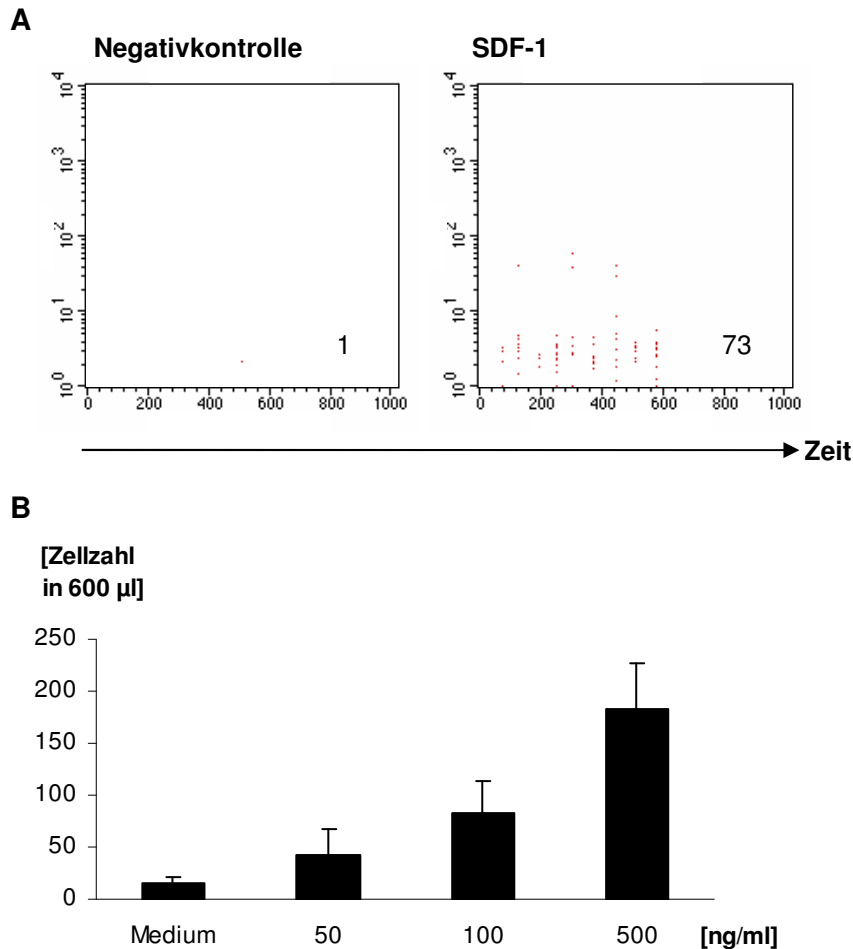


Abb. 14: Migration von PDCs zu SDF-1

Konzentrationsabhängige Wanderung von frisch isolierten PDCs ($2,5 \times 10^4$ /100µl) zu SDF-1 in Konzentrationen von 50, 100 und 500 ng/ml. PDCs wurden in die Filter von Transwellplatten eingesetzt, zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und danach aus den Wells geerntet. **A** zeigt die durchflusszytometrisch ermittelte quantitative Zellzahl. Gegenübergestellt wurde eine Mediumbedingung als Negativkontrolle im Vergleich zu einer Bedingung mit SDF-1 in einer Konzentration von 500 ng/ml. In **B** wird der Mittelwert von zwei Spendern, jeweils in Duplikaten + SEM, gezeigt.

1.3 Synergistische Wirkung von Chemokinkombinationen auf die Migration

Bei Entzündungsreaktionen wie z. B. viralen Infektionen wandern plasmazytoide dendritische Zellen in sekundäre lymphatische Organe und reichern sich dort in hoch-endothelialen Venolen (HEV = *high endothelial venules*) an (Cella 1999). Für HEV konnte eine SDF-1-Expression gezeigt werden (Krug 2002), wobei SDF-1 als klassisch homöostatisches Chemokin eher den *steady state* der PDC-Migration vermittelt. Allein SDF-1 als Lockstoff während eines akut inflammatorischen Geschehens schien folglich kaum plausibel.

Daraus leitete sich die Hypothese ab, dass ein Synergismus zwischen den verschiedenen Chemokinen bestehen könnte und nur durch die Kombination von CXCR3- oder CCR5-Liganden mit SDF-1 weitere PDCs angelockt würden.

Dem oben beschriebenen Chemotaxis-Assay gemäß wurden frisch isolierte PDCs ($2,5 \times 10^4$ /100µl) nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37 °C aus der unteren Kammer der Transwellplatte geerntet und die quantitative Zellzahl durchflusszytometrisch analysiert. Die verwendeten Chemokine wurden in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: MIG, Rantes und IP-10 in 300 ng/ml und SDF-1 in 100 ng/ml. Die Ergebnisse von insgesamt sechs Spendern, alle in Duplikaten, wurden zusammengefasst und als Vielfaches des Mediumwertes (=1) dargestellt. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, erfolgt die PDC-Migration auf die einzelnen Chemokine hin nur bei IP-10 und SDF-1. Verglichen mit der Mediumkontrolle war diese Bewegung der PDCs signifikant ($p = 0,02$). Bei der Kombination von SDF-1 mit einem der anderen Chemokine kommt es zu einer deutlichen Steigerung der angelockten Zellen. Diese lässt sich nicht allein aus der Addition der einzelnen Chemokine (mit Ausnahme von IP-10 und SDF-1) erklären. Die Dreier-Kombination aus SDF-1, MIG und Rantes führt zu keiner erheblichen Steigerung mehr im Vergleich zu SDF-1 plus MIG (sowohl MIG+SDF-1 als auch MIG+Rantes+SDF-1 hochsignifikant mit $p = 0,006$ bzw. $p = 0,009$ gegenüber SDF-1 alleine). Somit scheint ein Synergismus, beispielsweise über eine Kopplung der Signalketten, zu bestehen. SDF-1 ist bereits im *steady state* vorhanden. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion könnte die zusätzliche Expression oder Ausschüttung von inflammatorischen Chemokinen wie MIG oder Rantes zusammen mit dem bereits vorhandenen SDF-1 zu einer gesteigerten Migration von PDCs zum Ort der Infektion führen.

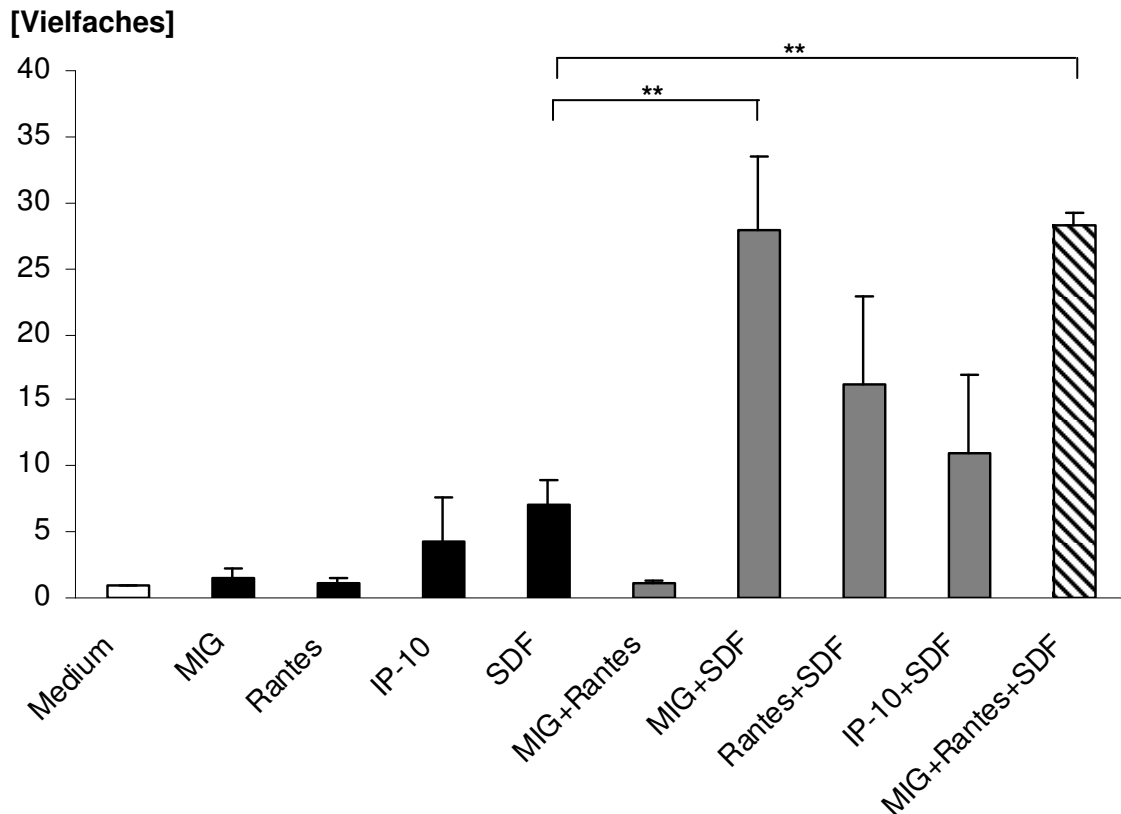


Abb. 15: Synergistischer Effekt von Chemokinkombinationen auf die Migration von PDCs

Wanderung von PDCs ($2,5 \times 10^4$ /100 μ l) zu verschiedenen Chemokinen (MIG, Rantes und IP-10 in 300 ng/ml und SDF-1 in 100 ng/ml) einzeln und in Kombinationen. PDCs wurden oben in die Filter von Transwellplatten eingesetzt, zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und danach aus den unteren Wells geerntet. Die quantitative Zellzahl wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Vielfaches der Mediumkontrolle + SEM (n = 6 in Duplikaten).

** kennzeichnet $p < 0,01$ (hochsignifikant).

2 Migration von PDCs zur eigenen Zellpopulation

Die gezeigten Chemokindaten legten die Vermutung nahe, dass neben den synergistisch wirkenden Chemokinen zahlreiche weitere Stimuli einzeln oder in Kombination das migratorische Verhalten von plasmazytoiden dendritischen Zellen beeinflussen könnten. Im entzündeten Gewebe wie z. B. nach einer Virusinfektion und entsprechend einer CpG-Stimulation, befindet sich selten eine einzelne PDC, sondern es kommt zum Influx zahlreicher PDCs. Dies führte zu der Überlegung, dass wahrscheinlich PDCs selbst chemotaktische Signale aussenden, die weitere PDCs bzw. andere Zellpopulationen anlocken. Aus den vorangegangenen Versuchen war bekannt, dass CXCR3-Liganden zusammen mit SDF-1 einen starken Stimulus für die PDC-Migration darstellen. PDCs sezernieren zwar CXCR3-Liganden, jedoch kein SDF-1.

Die Vermutung lag nahe, dass es noch unbekannte chemotaktische Signale geben müsste, die von der PDC produziert werden und die zugleich auf die eigene wie auch auf andere Zellpopulationen wirken. Um all diese Faktoren in die Fragestellung einzubeziehen, wurde ein Migrations-Assay mit PDC-Überständen als chemotaktisch aktiver Substanz aufgebaut. Von besonderem Interesse war dabei, ob von PDCs weitere Zellen angelockt werden und wenn ja, unter welchen Bedingungen dies vorwiegend passiert.

Frisch isolierte plasmazytoide dendritische Zellen wurden für 48 Stunden mit IL-3 (10 ng/ml) inkubiert und zur Stimulation zusätzlich entweder ODN 2006 oder 2216 (3 µg/ml) hinzugegeben. Die Stimulation nur mit IL-3, auch um das Überleben der recht anfälligen Zellpopulation zu gewährleisten, spiegelt dabei am ehesten die chemotaktische Produktion einer *steady state*-PDC wider. Die Stimulation mit CpG-ODN steht hingegen für eine PDC während einer Entzündungsreaktion.

Die gewonnenen Überstände wurden für die Migrationsversuche im Verhältnis 1:5 mit Medium in die unteren Kammern der Transwellplatten pipettiert und wiederum frisch isolierte PDCs in einer Konzentration von $2,5 \times 10^4$ /100µl als migrierende Population oben in die Filter eingesetzt. In Vorversuchen war in Migrationsexperimenten und in Kalziumfluxuntersuchungen ausgeschlossen worden, dass CpG-Oligonukleotide per se eine chemotaktische Aktivität für PDCs besitzen. Abbildung 16A ist zu entnehmen, dass PDCs bereits zu den mit IL-3 inkubierten Überständen wanderten, wenn auch nur in geringer Zahl. Die Stimulation mit ODN 2006 führte zu einem deutlichen Anstieg der chemotaktischen Aktivität des PDC-Überstandes, der durch die Stimulation mit ODN 2216 nochmals auf das fast Fünffache anstieg: hier kam es zu einer hochsignifikanten Steigerung ($p = 0,009$) der migrierten Zellen gegenüber dem mit IL-3 generierten Überstand. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Spendern in Triplikaten.

In einem weiteren Experiment wurden zusätzlich Überstände von myeloiden dendritischen Zellen (MDCs) gewonnen und der Wirkung von PDC-generiertem Überstand gegenübergestellt. MDCs waren dabei mit LPS in einer Konzentration von 1 µg/ml stimuliert worden. Zahlreiche Veröffentlichungen (Banchereau 2000; Grouard 1997; Olweus 1997) hatten die Unterschiede zwischen plasmazytoiden und myeloiden dendritischen Zellen bezüglich ihrer Morphologie, Lokalisation und Funktion herausgearbeitet. Offen blieb, ob sich die beiden Subpopulationen dendritischer Zellen nicht gegenseitig günstig beeinflussen könnten. Wie Abbildung 16B demonstriert, konnten die bereits gewonnenen Daten mit PDC-Überständen reproduziert werden, die Migration von PDCs zu LPS-stimulierten MDC-Überständen war dagegen gering.

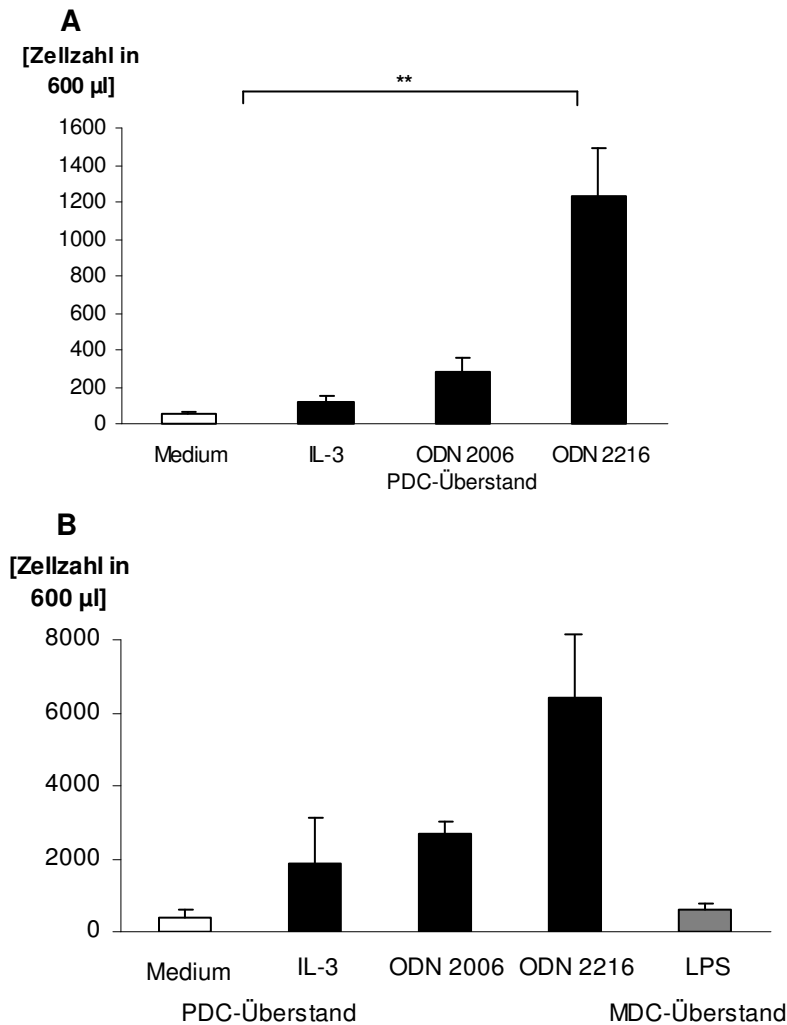


Abb. 16: Migration von PDCs zu Überständen von stimulierten PDCs und MDCs

Frisch isolierte PDCs ($2,5 \times 10^4$ /100µl) wanderten zu PDC-Überständen. Diese wurden in einer Konzentration von 20% in Medium in die Transwells eingesetzt. Die Überstände waren zuvor nach 48-stündiger Inkubation der PDCs mit IL-3 (10 ng/ml) und CpG-ODN 2006 bzw. 2216 (jeweils 3 µg/ml) gewonnen worden. In **A** wird der Mittelwert von vier unterschiedlichen Spendern, jeweils in Triplikaten + SEM gezeigt. ** kennzeichnet $p < 0,01$ (hochsignifikant). **B** zeigt einen weiteren Versuch mit zwei Spendern in Duplikaten, bei dem zusätzlich das chemotaktische Verhalten der PDCs zu MDC-Überstand (stimuliert mit LPS 1 µg/ml) untersucht wurde.

Die Chemotaxisversuche mit PDC-Überständen lassen vermuten, dass die Stimulation mit CpG-ODN, vor allem ODN 2216, zur Sekretion löslicher Faktoren in PDCs führt und diese einzeln oder in Kombination in der Lage sind, die eigene Zellpopulation anzulocken. Experimente mit Überständen als chemotaktische Substanz erlauben jedoch nur eine Momentaufnahme zu einem bestimmten Zeitpunkt, in diesem Fall nach 48 Stunden Stimulation. Der zeitliche Verlauf bezüglich Sekretion oder auch Elimination von Stimuli und demzufolge möglicherweise veränderter Wirkung auf das chemotaktische Verhalten der PDCs blieb unberücksichtigt. Um dies weiter

untersuchen zu können, wurden in einem zweiten experimentellen Ansatz lebende PDCs unten in die Transwells eingesetzt, um die PDCs im oberen Kompartiment einem physiologischeren zeitlichen Verlauf der Chemokinproduktion durch stimulierte PDCs auszusetzen.

Dazu wurden die oben eingesetzten wandernden PDCs mit CFSE (5- [und -6-]-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester) angefärbt, das im FACS-Gerät in den FITC-Kanal ausstrahlt. Somit konnten die angefärbten Zellen von den bereits als Produzenten der chemotaktischen Stimuli im unteren Transwellkompartiment befindlichen Zellen unterschieden werden. Nach zweistündiger Inkubation zur Migration erfolgte direkt durchflusszytometrisch die Untersuchung der einzelnen Proben. In Abbildung 17A ist zur Veranschaulichung der CFSE-Färbung beispielhaft eine Bedingung mit ODN 2216 herausgegriffen, in der die unten eingesetzten ungefärbten PDCs sehr gut von den gewanderten CFSE-positiven Zellen differenziert werden können.

Abbildung 17B fasst das Ergebnis der CFSE-gefärbten PDC-Migration mit insgesamt drei Spendern, alle in Duplikaten, zusammen. Tendenziell ließen sich die früheren Versuche bestätigen. Sowohl mit plasmazytoiden dendritischen Zellen generierte Überstände als auch die mit IL-3 inkubierten Zellen fungieren als chemotaktischer Stimulus. Während in den oben dargestellten Experimenten die Migration auf ODN 2216 immer deutlich überlegen war, verhielt sich das bei dieser Versuchskonstellation weniger eindeutig: ODN 2006 erzielte sogar leicht höhere (52 versus 47) Zellzahlen. Bereits die PDCs, die nur mit IL-3 inkubiert worden waren, um ihr Überleben sicher zu stellen, hatten verhältnismäßig viele Zellen angelockt.

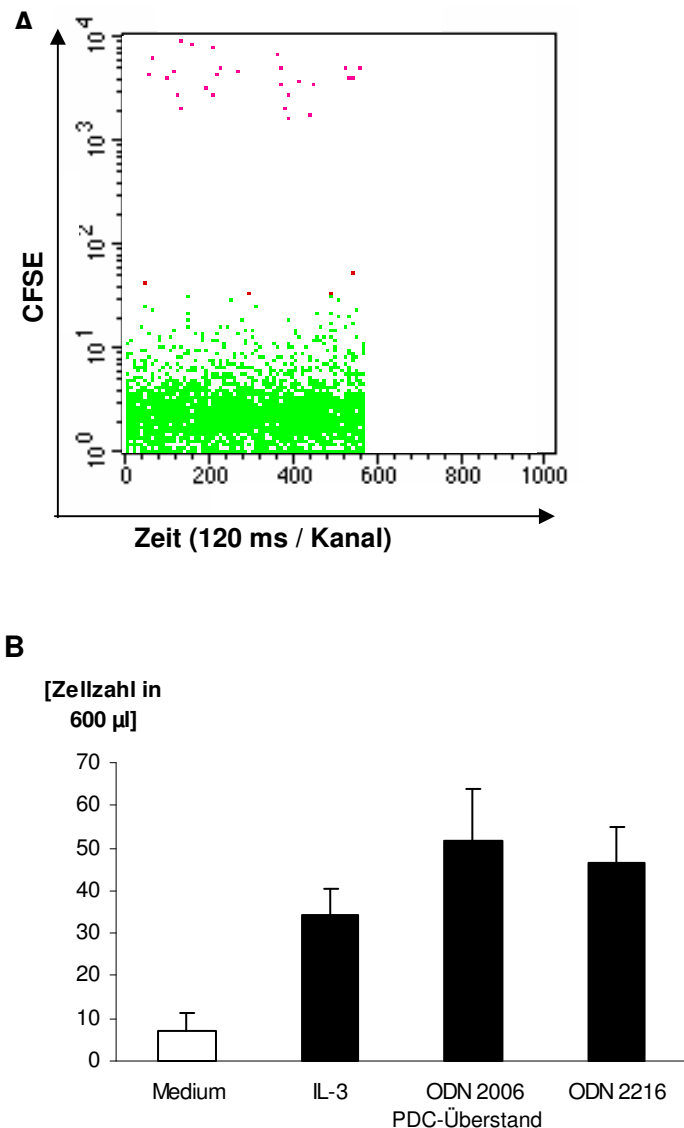


Abb. 17: Migration von PDCs zu CFSE-gefärbten, stimulierten PDCs

Für 18 Stunden mit IL-3 inkubierte PDCs (5×10^4 /ml) wanderten zu PDCs (5×10^4 /600 μ l), die 36 Stunden mit IL-3 (10 ng/ml), ODN 2006 und ODN 2216 (jeweils 3 μ g/ml) stimuliert worden waren. Zur Unterscheidung waren diejenigen PDCs, die man oben in die Transwellfilter einsetzte, zuvor mit CFSE (1 μ M) angefärbt worden (**A**) und konnten so durchflusszytometrisch von den im unteren Transwell-Kompartiment residenten ungefärbten PDCs unterschieden werden. Gezeigt wird beispielhaft eine Bedingung mit ODN 2216. In **B** ist der Mittelwert von drei Spendern (alle in Duplikaten) + SEM dargestellt.

3 Migration von T-Zellen zu PDCs

Aufbauend auf die erzielten Resultate erfolgte die Identifizierung weiterer Zielzellen, die durch die chemotaktische Aktivität von PDCs in ihrem migratorischen Verhalten beeinflusst werden. Dazu wurde die Wirkung von PDC-Überständen unter den Bedingungen *steady state* (Inkubation nur mit IL-3) und nach Infektion (entsprechend einer CpG-Stimulation) auf die Migration peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs) untersucht. Im Versuchsansatz wurden dazu unten in die Transwells PDC-Überstände, in das obere Kompartiment PBMCs in einer Konzentration von 1 Mio/ml eingesetzt und für zwei Stunden inkubiert. Von Interesse war dabei die Verschiebung der prozentualen Zusammensetzung der gewanderten Zellen im Vergleich zu den eingesetzten Zellen, um so herauszufinden, welche Zellpopulationen aus der Gesamtheit der PBMCs angelockt würden. Die Zusammensetzung der gewanderten Zellen wurde dann durchflusszytometrisch analysiert und dabei der prozentuale Anteil aller T-Zellen ($CD3^+$), der T-Helferzellen (= Th-Zellen, $CD3^+$, $CD4^+$), der zytotoxischen T-Zellen (= T-Effektorzellen, $CD3^+$, $CD8^+$), der B-Zellen ($CD19^+$) und Monozyten ($CD14^+$) bestimmt.

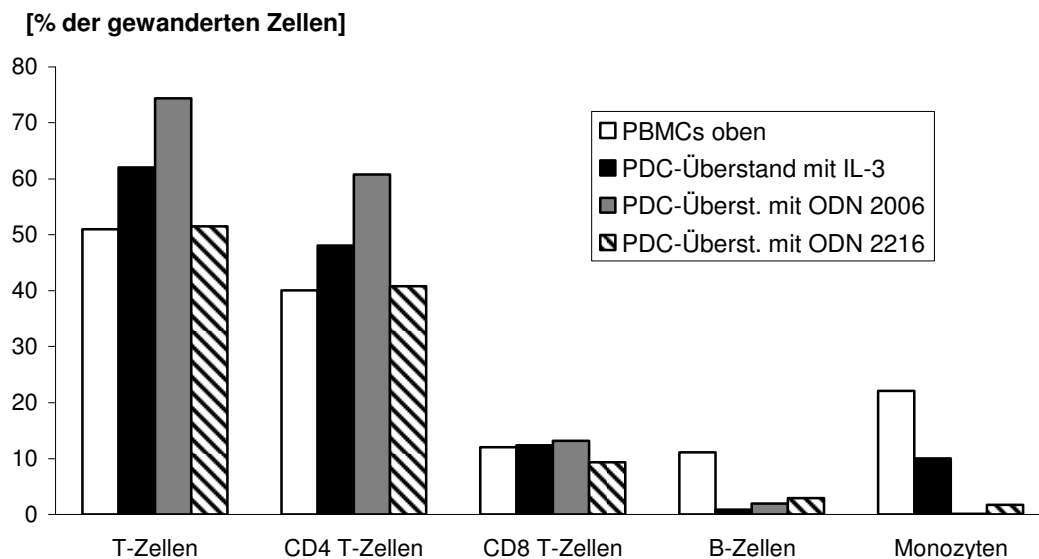


Abb. 18: Wanderung von $CD4^+$ T-Zellen zu PDC-Überständen

Frisch isolierte PBMCs (1 Mio/ml) wurden nach der Migration zu PDC-Überständen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen charakteristische Oberflächenmarker für T-Zellen, sowie T-Helfer- ($CD4^+$) und zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$), B-Zellen und Monozyten angefärbt. Gezeigt wird die Zusammensetzung der unter den verschiedenen Bedingungen gewanderten Zellpopulationen im Vergleich zur Zusammensetzung der oben eingesetzten PBMCs.

Wie in Abbildung 18 zu sehen, wanderten hauptsächlich T-Zellen und von diesen wiederum überwiegend CD4⁺ Th-Zellen. Die meisten T-Helferzellen wanderten zu PDC-Überständen, die mit ODN 2006 stimuliert worden waren, während ODN 2216 praktisch keine Zellen anlockte. Im Gegensatz dazu waren weder B-Zellen noch Monozyten gewandert.

Dieses interessante Ergebnis wurde im Folgenden weiter untersucht, um die von PDCs angelockten T-Zellpopulationen genauer zu charakterisieren. Um zu überprüfen, ob es sich bei den gewanderten Th-Zellen vor allem um Th1- oder Th2-Zellen handelte, wurden diese Subpopulationen generiert. Außerdem sollten als Lockzellen neben PDCs auch MDCs betrachtet werden. Während Th1-Zellen eher eine zelluläre Immunität induzieren und somit Schutz gegen intrazelluläre Infektionen und Tumore bieten, fördern Th2-Zellen vor allem die humorale Immunantwort und wehren darüber extrazelluläre Erreger ab. Zur Differenzierung von naiven Zellen zu Th1- versus Th2-Zellen, wurden - wie bei Kalinski (2000) beschrieben - CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von IL-2 und beschichtet mit anti-CD3 und anti-CD28 Dynabeads als Stimulus sowie mit IL-12 und anti-IL-4 für sieben Tage inkubiert, um Th1-Zellen zu erhalten bzw. mit IL-4 und anti-IL-12 kultiviert, um eine Verschiebung in Th2-Richtung zu induzieren. In Abbildung 19 ist das migratorische Verhalten von Th1- (A) im Vergleich zu Th2-Zellen (B) zu PDCs und MDCs gegenüber gestellt: Die ursprüngliche Fragestellung, ob eher Th1- oder Th2-Zellen von PDCs angelockt werden, kann nicht eindeutig beantwortet werden: sowohl für die PDC im *steady state*, als auch für die CpG-B-stimulierte PDC besteht kein relevanter Unterschied zwischen den beiden T-Zellpopulationen. CpG-A-stimulierte PDCs ziehen tendenziell eher Th2- als Th1- differenzierte Zellen chemotaktisch an. LPS-stimulierte MDCs zeigen verglichen mit CpG-B-stimulierten PDCs keinen Unterschied im Anlocken von Th1-Zellen; sie üben jedoch eine etwas stärkere Anziehung auf Th2-Zellen aus.

In weiteren Experimenten wurden aus PBMCs durch magnetische Zellseparation naive (= CD45RA⁺) CD4⁺, reife (= CD45RO⁺) CD4⁺ und zytotoxische CD8⁺ T-Zellen gewonnen. Am ehesten wanderten naive CD4⁺ T-Zellen (Daten nicht gezeigt), während sowohl reife CD4⁺ als auch zytotoxische T-Zellen kaum von PDCs, ob im *steady state* oder nach Stimulation, angelockt wurden (siehe auch Abb. 18).

Schließlich folgten Versuche mit aufgereinigten B-Zellen und Monozyten. Auch hier erfolgte keine Migration zu CpG-stimulierten PDC-Überständen (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis glich darin dem Versuch mit PBMCs (siehe wieder Abb. 18).

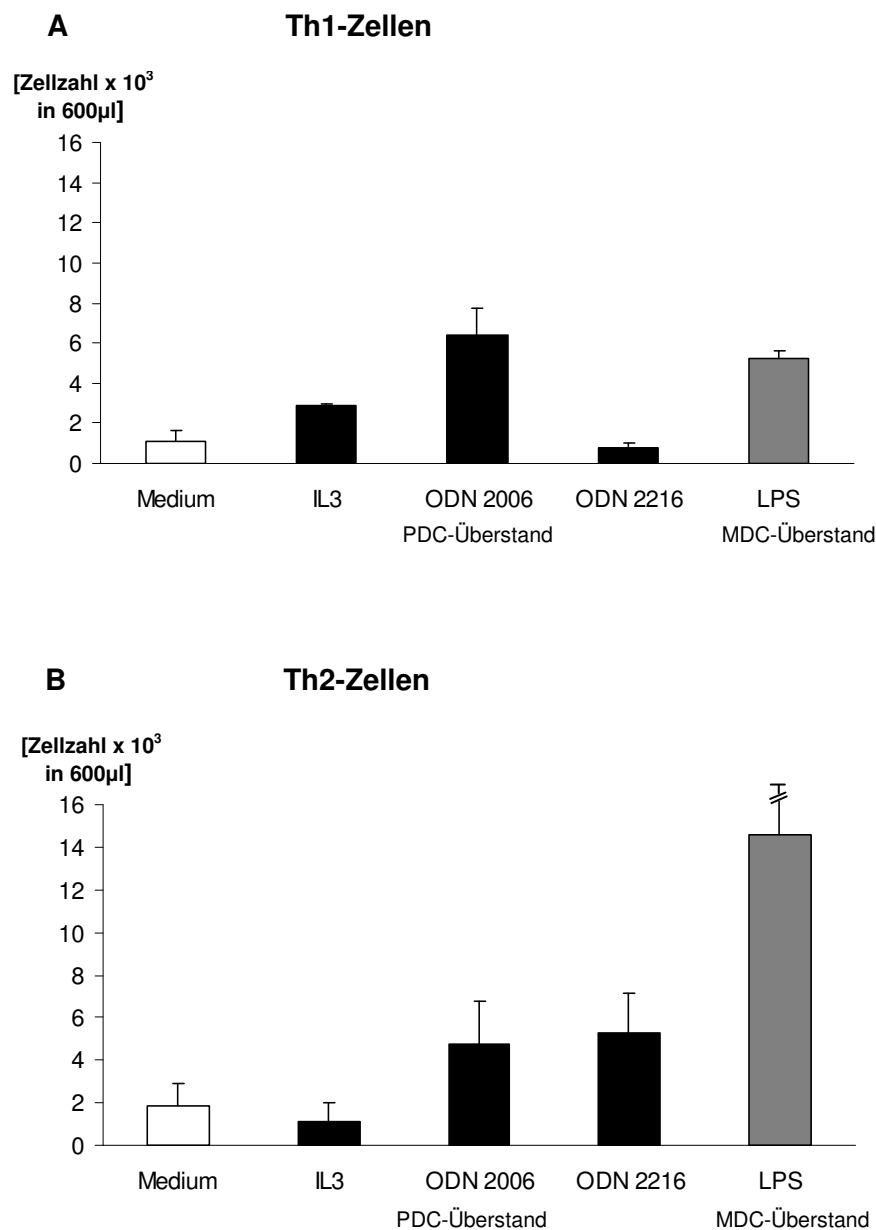


Abb. 19: Wanderung von Th1- und Th2-Zellen zu PDC- und MDC-Überständen

Aus frisch isolierten naiven (CD45RA⁺) CD4⁺ T-Zellen wurden Th1- und Th2-Zellen generiert und in einer Konzentration von 1 Mio/ml in Transwellplatten eingesetzt. Dargestellt ist in **A** das migratorische Verhalten der Th1-Zellen, in **B** das der Th2-Zellen zu PDC- (Stimulation mit IL-3, ODN 2006 und ODN 2216, schwarze Balken) und MDC-Überständen (Stimulation mit LPS, grauer Balken). Gezeigt sind die Mittelwerte von zwei charakteristischen Spendern + SEM.

Teil II: Die Wirkung von Adenosin auf plasmazytoide dendritische Zellen

Das ubiquitär vorkommende Purin-Nukleosid Adenosin dient einerseits als Baustein von Nukleinsäuren und ATP, andererseits reguliert es verschiedenste Funktionen von Körperzellen. Diese regulatorischen Eigenschaften vermittelt Adenosin über Rezeptoren, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Es fungiert somit als Signalmolekül über Bindung an diese Adenosinrezeptoren (Ralevic 1998). Während Entzündungsreaktionen wird Adenosin von aktivierten oder gestressten Zellen freigesetzt, so dass es bei Gewebeschäden oder Ischämie akkumuliert und als endogenes Gefahrensignal angesehen werden kann. Aus der eigenen Arbeitsgruppe wie auch aus Publikationen anderer Gruppen gab es Vordaten zu chemotaktischen und funktionsmodulierenden Effekten von Adenosin auf myeloide DCs (Panther 2001 und 2003).

Der zweite Teil dieser Arbeit widmete sich der Frage, welche Wirkung das endogene Gefahrensignal Adenosin auf die Chemotaxis und die Zytokinproduktion von PDCs besitzt. Zunächst wurde die Adenosinrezeptor-Expression in PDCs auf mRNA-Ebene analysiert, anschließend das migratorische Verhalten und die Auswirkungen auf die Zytokinproduktion untersucht.

4 Der modulierende Effekt von Adenosin auf PDCs

4.1 Expression von Adenosinrezeptoren auf PDCs

Das Expressionsmuster der vier Adenosinrezeptor-Subtypen, die mit A_1 -, A_{2a} -, A_{2b} - und A_3 bezeichnet werden, wurde in plasmazytoiden dendritischen Zellen mittels RT-PCR untersucht. Frisch isolierte PDCs exprimierten mRNA für den A_1 -, nicht jedoch für den A_{2b} - oder A_3 -Rezeptor (Abb. 20). Die mRNA-Expression des A_{2a} -Rezeptors war in einigen Spendern auf niedrigem Level, in anderen Spendern nicht sichtbar. Nach Stimulation der PDCs mit IL-3 und CD40L über Nacht kam es zu einer verminderten mRNA-Transkription des A_1 -Rezeptors und einer Hochregulation der A_{2a} -Rezeptor-mRNA. Ebenso wie in unreifen konnte auch in reifen PDCs weder mRNA für den A_{2b} - noch den A_3 -Rezeptor detektiert werden.

Die PCR des A_1 -Rezeptors zeigte ein zusätzliches zweites Produkt, das länger als das erwartete von 278 Basenpaaren (bp = base pair) war und das nach Reifung der PDCs

vermindert exprimiert wird. Die DNA-Sequenzierung ergab, dass dieses 483 bp lange Produkt die erwartete A₁-Rezeptor-Sequenz mit einem zusätzlichen Zwischenstück von 205 bp Länge enthält. Es gehört zu der 3'-Region des Introns, zwischen Exon 5 und 6, des A₁-Rezeptor-Gens. Diese Nukleoside waren wahrscheinlich wegen eines alternativen höher gelegenen *Splicing*-Platzes mit in das Produkt aufgenommen worden. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass dieses neue Produkt für einen funktionellen Adenosinrezeptor kodiert (Fredholm 2001), da es durch das Zwischenstück zu einem *frame shift* kommt. Dadurch entsteht ein Protein, das nach Helix III abgeschnitten ist und damit die Adenosin-Bindungsstelle in den Helices III und VII wie auch die G-Protein-Bindungsstelle betrifft (Fredholm 2001).

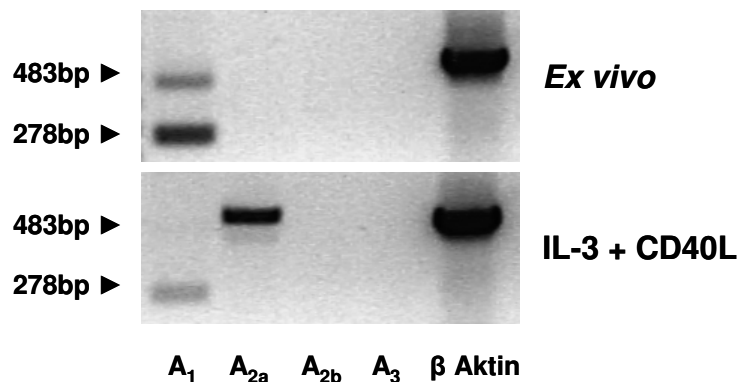


Abb.20: Adenosinrezeptorexpression auf PDCs

Extraktion von mRNA aus aufgereinigten PDCs (Reinheit > 96%) direkt nach Isolation oder nach Kultur mit IL-3 (10 ng/ml) und CD40L über Nacht. Die Bestimmung der Profile der A₁-, A_{2a}-, A_{2b}- und A₃-Rezeptor-Expression erfolgte mittels RT-PCR. Eines von sechs repräsentativen Experimenten ist gezeigt.

4.2 Chemotaxis von PDCs zu Adenosin

Unter der Voraussetzung, dass plasmazytoide dendritische Zellen Adenosinrezeptoren exprimieren, galt das Interesse als nächstes der Frage, ob Adenosin auch als chemotaktischer Stimulus für PDCs fungieren könnte, wie es für andere Leukozytenpopulationen gezeigt werden konnte (Panther 2001; Rose 1988).

In einem Migrationsassay - wie bereits beschrieben - wurden frisch aufgereinigte PDCs in einer Konzentration von $2,5 \times 10^4$ untersucht. Adenosin stellt bereits in einer niedrigen Konzentration von 1 μ M einen potenten Lockstoff für plasmazytoide dendritische Zellen dar, wie Abbildung 21 demonstriert (15 versus 176 Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle). In der höheren Konzentration (100 μ M) lässt sich das Wanderungsverhalten nochmals deutlich steigern.

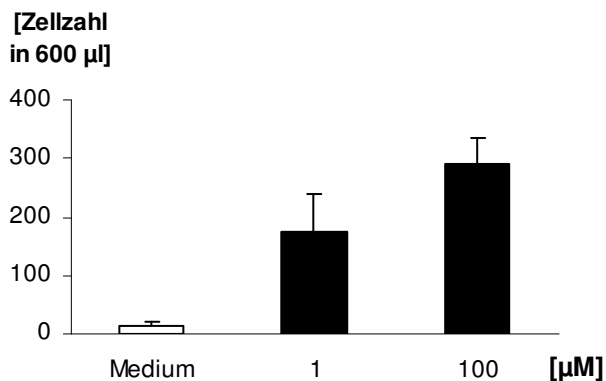


Abb. 21: PDC-Migration zu Adenosin

Konzentrationsabhängige Wanderung von frisch isolierten PDCs zu Adenosin in einer Konzentration von 1 und 100 µM. PDCs wurden in die Filter von Transwellplatten eingesetzt, zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und danach aus den Wells geerntet. Die quantitative Zellzahl wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt wird der Mittelwert von zwei Spendern, jeweils in Duplikaten + SEM.

4.3 Inhibition der Zytokinproduktion in reifen PDCs durch Adenosin

Bereits vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass die Signalkaskade über den A_{2a} -Rezeptor mit anti-inflammatorischen Eigenschaften in verschiedenen Zellpopulationen wie dendritischen Zellen oder Makrophagen verknüpft ist (Hasko 2000; Link 2000; Panther 2003) und die Produktion verschiedener inflammatorischer Zytokine wie IFN- α , Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α = *tumor necrosis factor- α*), IL-1 β , IL-6 und IL-12 (Kadowaki 2000; Krug 2001a; Bauer 2001) hemmt. Es sollte daher untersucht werden, ob Adenosin neben der Chemotaxis auch die Zytokinproduktion von plasmazytoiden dendritischen Zellen nach Stimulation mit CpG-ODN beeinflusst. Dazu wurden PDCs mit ODN 2006 und CD40L-transfizierten Fibroblasten in An- oder Abwesenheit von Adenosin inkubiert. Da Krug et al. 2001 herausgefunden hatte, dass die Vorinkubation der PDC mit IL-3 vor der eigentlichen Stimulation mit Oligonukleotiden und CD40L zu einer Steigerung der IL-12-Produktion führt, wurden in einigen Experimenten die PDCs 60 Stunden mit IL-3 (10 ng/ml) vorinkubiert, bevor sie mit CpG und CD40L stimuliert wurden. Die 60-stündige Vorinkubation mit IL-3 sichert nicht nur das Überleben der Zellen, sondern führt auch zu einer milden Ausreifung der PDCs.

Mit CpG und CD40L stimulierte PDCs produzierten besonders große Mengen an IFN- α und IL-6 (Mengen im Nanogrammbereich). In unreifen PDCs nahm Adenosin keinen eindeutigen Einfluss auf die Zytokinfreisetzung. Hingegen kam es bei den mit IL-3 für 60 Stunden vorinkubierten PDCs zu einer signifikanten Inhibition der Produktion von

IFN- α und IL-6 (Abb. 22A und B). Zusätzlich produzierten diese reifen PDCs auch große Mengen an IL-12p40 und IL-12p70 (Krug 2001a), die sich wiederum durch Adenosin supprimieren ließen (Abb. 22C und D). Die hemmende Wirkung von Adenosin vor allem auf ausgereifte PDCs lässt sich gut mit der gezeigten veränderten Adenosinrezeptor-Expression in PDCs korrelieren (Abb. 20). Die Expression des A_{2a}-Rezeptors, der in anderen Zellpopulationen die Zytokinproduktion inhibiert (Hasko 2000; Link 2000), ist in mit IL-3 ausgereiften PDCs verstärkt. Diese Ergebnisse unterstreichen eine wichtige Funktion von Adenosin in der Modulation der Zytokinproduktion von reifen PDCs. Adenosinkonzentrationen bis zu 250 μ M hatten dabei keinen Effekt auf die Vitalität der PDCs, so dass mögliche toxische Effekte bei solch hohen Konzentrationen ausgeschlossen werden konnten.

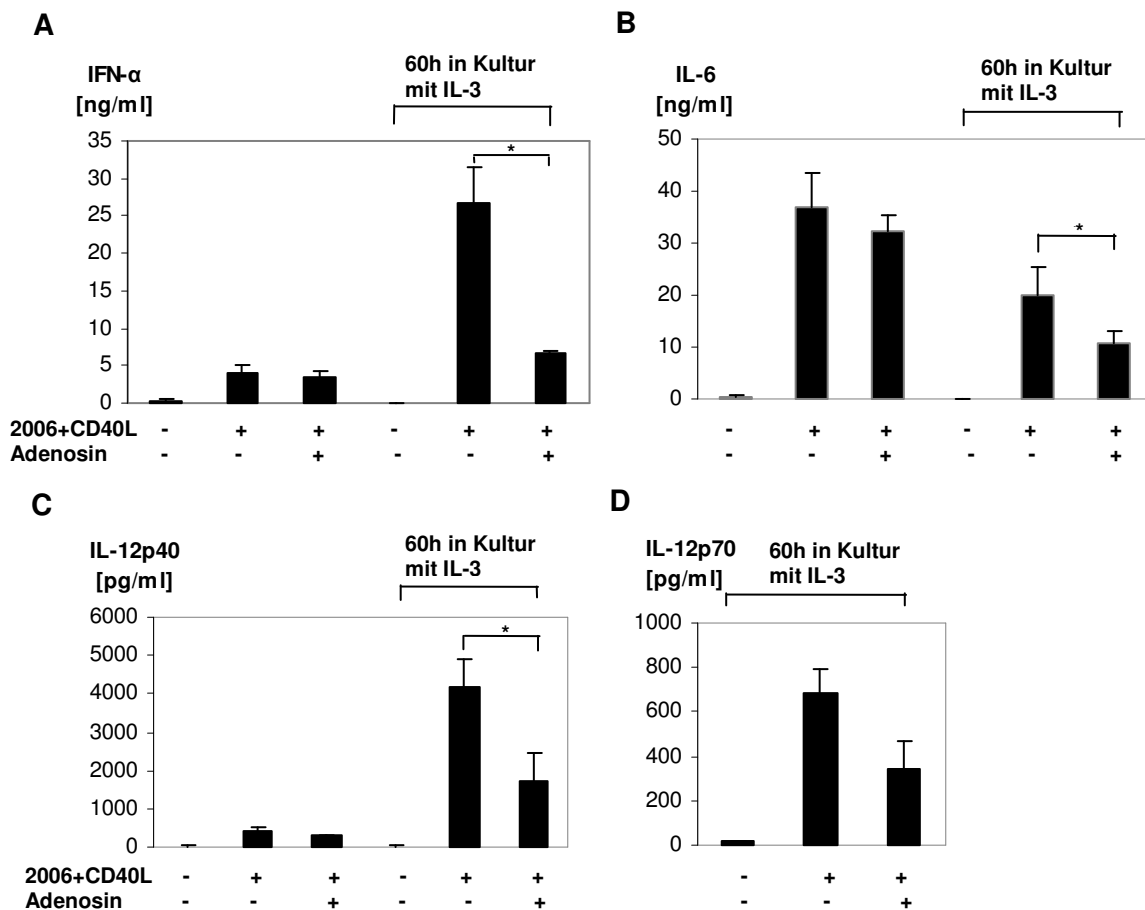


Abb. 22: Hemmung der Zytokinproduktion in reifen PDCs durch Adenosin: PDCs ($2,5 \times 10^5$ /ml) wurden mit CpG-ODN 2006 (3 μ g/ml) und CD40L-transfizierten Fibroblasten mit oder ohne Adenosin (100 μ M) stimuliert. Entweder wurden frisch isolierte oder mit IL-3 für 60 Stunden vorinkubierte PDCs eingesetzt. Nach 48 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Konzentration von IFN- α (A), IL-6 (B), IL-12p40 (C) und IL-12p70 (D) im Überstand mittels ELISA detektiert. Die Ergebnisse zeigen drei repräsentative Spender und sind als Mittelwert + SEM dargestellt. * kennzeichnet $p < 0,05$ (signifikant).

D Diskussion

1 Übersicht über die experimentellen Befunde

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem migratorischen Verhalten der plasmazytoiden dendritischen Zelle und mit ihrer Einflussnahme auf das chemotaktische Verhalten anderer Zellen nach Stimulation mit endogenen und exogenen Gefahrensignalen. PDCs nehmen als Antigen-präsentierende Zellen (APCs) eine wichtige Rolle in der Regulation von Immunantworten ein, indem sie zwischen angeborenem und erworbenem, Antigen-spezifischem Immunsystem vermitteln. Als Modulatorzellen können sie zu einer Aktivierung wie auch zu einer Inhibition von überschießenden Reaktionen führen. Die jeweilige adäquate Funktion ist dabei abhängig von der Integration der Signale lokaler Entzündungsfaktoren und dem Reifegrad der PDC.

Die Migration plasmazytoider dendritischer Zellen in sekundäre lymphatische Organe wie auch zu Entzündungsorten ist von einer Kaskade diskreter Ereignisse abhängig, inklusive der Chemokinproduktion und Regulation von Chemokinrezeptoren. Während in unreifen PDCs praktisch keine Chemokine nachweisbar sind, produzieren sie nach Stimulation mit CpG als dem PAMP einer viralen Infektion IP-10, MIP-1 α und Rantes. Die Antwort auf chemotaktische Stimuli ist unabdingbar für eine optimale Immunantwort.

Im unreifen Zustand exprimieren PDCs die Chemokinrezeptoren CCR5, CXCR3 und CXCR4, in etwas niedrigerer Intensität auch CCR2 und CCR7. Nach Ausreifung der PDC wird CCR7 hoch-, die übrigen Rezeptoren herunterreguliert. Dennoch sind nicht alle der exprimierten Rezeptoren funktionell aktiv, da in den unreifen PDCs auf intrazellulärer Ebene nur nach Stimulation mit SDF-1 ein Kalziumflux nachweisbar ist, nicht jedoch auf CXCR3- und CCR5-Liganden. In Korrelation dazu stellt das homöostatische Chemokin SDF-1 den stärksten Stimulus für das chemotaktische Verhalten der PDC dar, während sowohl CXCR3- als auch CCR5-Liganden einzeln keine Migration bewirken. Dennoch besteht bezüglich der PDC-Migration ein Synergismus unter den Chemokinrezeptoren. Die Ergebnisse zeigen, dass die CXCR3-Liganden MIG und IP-10 sowie der CCR5-Ligand Rantes - obwohl von sich aus nicht in der Lage, Kalziumflux oder Migration zu induzieren - in Kombination mit SDF-1 synergistisch die Migration von PDCs steigern. Neben den verschiedenen, teils

nicht funktionellen Chemokinrezeptoren, exprimieren PDCs zusätzlich Adenosinrezeptoren; Adenosin wirkt als potenter chemotaktischer Stimulus auf unreife PDCs.

Der Nachweis unterschiedlicher Stimuli auf die PDC-Migration, führte zu der Überlegung, ob sich plasmazytoide dendritische Zellen auch untereinander beeinflussen und anziehen. Während unstimulierte PDCs kaum weitere PDCs anlocken, kommt es nach CpG-Stimulation zu einer deutlichen Steigerung der gewanderten Zellen. Oligonukleotide binden an TLR9 und induzieren eine Ausreifung, eine Aktivierung und eine gesteigerte Zytokinproduktion in PDCs - sind jedoch selbst keine chemotaktisch aktiven Substanzen. Welche chemotaktischen Faktoren letztendlich das Anlocken einer PDC durch eine andere vermitteln, ist noch unklar. Sowohl ODN 2006 als auch ODN 2216 stellen potente Stimuli für die Induktion dieser chemotaktischen Aktivität dar, mit dem Unterschied, dass mit ODN 2216 stimulierte PDCs deutlich mehr PDCs anlocken. Im Vergleich zu PDCs nehmen die mit LPS-stimulierten myeloiden dendritischen Zellen (MDCs) kaum Einfluss auf das Wanderungsverhalten der PDC.

Da die stimulierte PDC weitere PDCs anlockt, wurde im Folgenden das chemotaktische Verhalten anderer Zellpopulationen zur PDC hin analysiert. Hier zeigt sich, dass vorwiegend T-Zellen zu PDCs wandern, während aktivierte PDCs keine chemotaktische Aktivität auf B-Zellen oder Monozyten ausüben. Innerhalb von PBMCs wandern hauptsächlich $CD4^+$ T-Zellen zu den PDCs. Des Weiteren ergab eine genauere Analyse der T-Zell-Populationen, dass vor allem naive und im Vergleich zu Th2-Zellen eher Th1-Zellen von PDCs angelockt werden. Im Gegensatz dazu wirken MDCs eher auf Th2-Zellen chemotaktisch. Dies gilt jedoch nur für CpG-B-stimulierte PDCs bzw. LPS-stimulierte MDCs.

Neben der bereits erwähnten chemotaktischen Wirkung von Adenosin, exprimieren PDCs entsprechend ihres Reifegrades unterschiedliche Adenosinrezeptoren. Die Migration unreifer PDCs zu Adenosin erfolgt über den A_1 -Rezeptor. Über den A_{2a} -Rezeptor auf reifen PDCs hingegen vermittelt Adenosin einen anti-inflammatorischen Effekt, der bewirkt, dass die durch CpG-Stimulation in PDCs induzierte Zytokinproduktion, vor allem von $IFN-\alpha$, aber auch IL-6 und IL-12, deutlich supprimiert wird.

Die gewonnenen Ergebnisse charakterisieren die bedeutende Stellung der plasmazytoiden dendritischen Zelle, die auf eine Vielzahl von Stimuli reagiert und mit zahlreichen anderen Zellpopulationen interagiert. Eine schematische Zusammenfassung der Befunde, die in der vorliegenden Arbeit erhoben wurden, zeigt Abbildung 23.

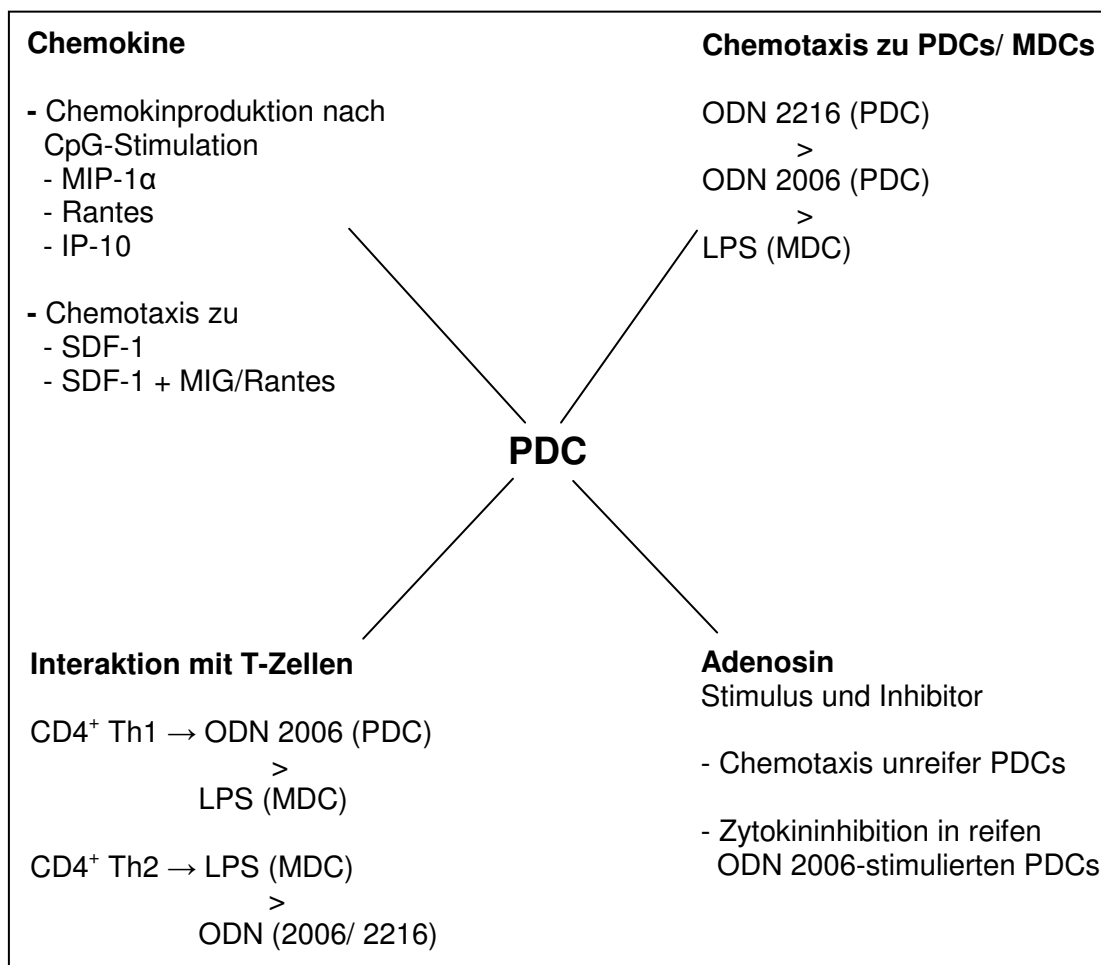


Abb. 23: Schematische Darstellung der PDC-Migration und -Interaktion
 Gezeigt werden die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse.

2 Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur

2.1 Die plasmazytoide dendritische Zelle als Chemokin-sensible Zelle

Die Induktion hoch spezifischer, adaptiver Immunantworten ist das Endergebnis eines komplizierten Sets zellulärer Mechanismen. Nur mithilfe gemeinsamer Anstrengung von angeborener und erworbener Immunität kann die Abwehr eindringender Pathogene gelingen. Die Kommunikation dieser beiden Systeme geschieht vorwiegend über Chemokine, Zytokine und Zell-zu-Zell-Interaktionen.

Chemokine sind wichtige Regulatoren für die Zellrekrutierung aus dem Blut in sekundäre lymphatische Organe. Während für myeloide dendritische Zellen bereits in zahlreichen Studien ihr Wanderungsverhalten zu Chemokinen hin nachgewiesen

werden konnte, gibt es bis dato nur wenige Publikationen zu ihrer Schwesterpopulation, der plasmazytoiden dendritischen Zelle. PDCs wandern vom Knochenmark, wo sie beim Erwachsenen gebildet werden, über das Blut und von dort via hoch-endothelialen Venolen (HEV) in T-Zell-Zonen von Lymphknoten, ähnlich wie Lymphozyten. Wahrscheinlich tragen verschiedenste Mechanismen zur Rekrutierung von PDCs zum Ort viraler Infektionen bei, die in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurden.

2.1.1 Stellt SDF-1 den einzigen chemotaktischen Stimulus dar?

Wie Penna et al. zeigte, wandern MDCs zu verschiedenen Chemokinen, darunter im Besonderen zu Rantes, MCP-1 und SDF-1, etwas schwächer zu Eotaxin, MIP-3 α , IP-10 und I-TAC (Penna 2001). Obwohl das Rezeptorexpressionsmuster auf beiden DC-Subpopulationen nicht so stark differiert - MDCs und PDCs exprimieren CCR2, CCR5, CXCR3 und CXCR4 - sprechen PDCs nur auf SDF-1 an, den Liganden für CXCR4 (Penna 2001). Das homöostatische Chemokin SDF-1 (CXCL12) konnte in verschiedenen Geweben und Zellen bestimmt werden, wie in Epithelzellen der Haut, HEV in Lymphknoten und malignen Zellen (Zou 2001). Auch bei bakteriellen Infektionen des zentralen Nervensystems (ZNS) werden PDCs in den Liquor angelockt. Ihre Anzahl korreliert dabei mit einer erhöhten SDF-1-Konzentration (Pashenkov 2002). Einzige Ausnahme zwischen den beiden Schwesterpopulationen im frühen Reifestadium besteht bezüglich des CCR7-Rezeptors, der sich nur auf PDCs nachweisen lässt.

Die Migrationskapazität unreifer PDCs zu den übrigen Liganden ihrer Rezeptoren wie MIP-1 α/β und Rantes für CCR5, ELC und SLC für CCR7, MIG und IP-10 für CXCR3 und MCP-1 für CCR2 war marginal (Penna 2002b). Penna formulierte die Hypothese, dass diese Rezeptoren zwar exprimiert würden, jedoch ohne funktionell aktiv zu sein. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten stimmen mit Pennas Aussagen überein. Setzt man die Chemokine einzeln als Stimulus ein, bewirkt lediglich SDF-1 die PDC-Migration. In Korrelation zur Migration kam es auch nur bei SDF-1 zu einem Kalziumflux aus PDCs, nicht jedoch bei den CXCR3-Liganden IP-10 oder MIG. Auch dies korreliert mit Pennas Ergebnis (Penna 2001).

Die Aktivierung der im Blut zirkulierenden PDCs durch mikrobielle Stimuli oder CD40-Ligand (CD40L) führt zur Ausreifung und Hochregulation von CD83 und CCR7. Nach ihrer Ausdifferenzierung verlieren PDCs ihr Wanderungsverhalten zu SDF-1, erlangen es jedoch - entsprechend der verstärkten CCR7-Expression - für MIP-3 β (CCL19 = ELC). Die Liganden des CCR7-Rezeptors, MIP-3 β und 6CKine (CCL21 = SCL) werden

wiederum in HEV exprimiert (Cella 1999) und können somit reife PDCs anlocken. Die Rezeptoren CCR2, CCR5, CXCR3 und CXCR4, die auf den unreifen PDCs nachweisbar sind, fallen in den reifen Zellen praktisch unter die Nachweisgrenze.

2.1.2 Synergismus zwischen SDF-1 und CXCR3- oder CCR5-Liganden

Sowohl der CXCR3-Ligand MIG als auch der CCR5-Ligand Rantes besitzt allein nicht die Fähigkeit, PDCs anzulocken. Entscheidend ist das Zusammenwirken mit SDF-1, das zu einer hochsignifikanten Steigerung der migrierten Zellen führt. Diese lässt sich nicht allein aus der Addition der einzelnen Chemokine erklären. Denkbar ist, dass Chemokinrezeptoren (CCR5, CXCR3), die zwar auf PDCs nachgewiesen werden konnten, ohne normalerweise funktionell zu sein, durch die Kopplung an CXCR4 aktiviert werden. Die Synergie zwischen homöostatischen Chemokinen, die für die konstitutive Migration der PDC in den Lymphknoten verantwortlich ist, und inflammatorischen Chemokinen reflektiert einen Sensibilisierungseffekt, der es ermöglicht, die PDC-Rekrutierung während entzündlicher Prozesse wie bei einer Virusinfektion zu kontrollieren. Vermutlich läuft dieser Synergismus zwischen SDF-1 und den CXCR3- und CCR5-Liganden auf Signaltransduktionsebene ab. Via SDF-1 können - so die Vermutung - die primär entkoppelten Rezeptoren der anderen Liganden aktiviert und damit auch funktionell werden. Welcher Schritt innerhalb der Signaltransduktion genau dafür verantwortlich ist, müssen weitere Versuche zeigen. Möglich wäre, dass bereits die Dissoziation der $G\alpha$ - von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins unterbleibt und so keine Signalkaskade ausgelöst wird. Entscheidend für die Zellmotilität ist jedenfalls die Aktivierung der Phospholipase-C, die letztendlich einen raschen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt (Thelen 2001); dies ist für die Modifikation von Adhärenzeigenschaften und damit die Migration unabdingbar.

Vergleichbare Ergebnisse konnte Krug et al. für SDF-1 und I-TAC erbringen (Krug 2002). Sie zeigte, dass CXCR3-Liganden, die von Th1-Zellen produziert werden, das Ansprechen der PDCs auf SDF-1 verdoppeln können. I-TAC stellt wie auch MIG einen weiteren CXCR3-Liganden dar. Ebenso gelang es Vanbervliet, die PDC-Migration in Kombination von SDF-1 mit einem CXCR3-Liganden (MIG, IP-10 oder I-TAC) zu steigern (Vanbervliet 2003). Die Schwelle für SDF-1 konnte mit den CXCR3-Liganden beeindruckend um das 20-50-fache gesenkt werden. Das homöostatische Chemokin SDF-1 ebnet wahrscheinlich den Weg zu inflammatorischen Chemokinen, so dass es zu einer wesentlich stärkeren chemotaktischen Reaktion als auf SDF-1 alleine kommt.

PDCs (mit der Bezeichnung DC2) infiltrieren Tumore, die in hohem Maße SDF-1 sezernieren und wandern *in vitro* durch eine Endothelzellschicht zu CXCR3-Liganden (Zou 2001). Diese können auch nach intravenöser Injektion von Propioni-acnes-Bakterium oder kutaner Herpes-simplex-Virus-Infektion die PDC-Migration in Lymphknoten bewirken (Yoneyama 2004). Yoneyama et al. konnte dies erstmals eindeutig beweisen, indem er PDCs aus CXCR3^{-/-}-Mäusen einsetzte und MIG (=CXCL9) blockierte, was die Zellwanderung unterband. Die CXCL9-Blockade verhinderte zusätzlich die Anlagerung der PDCs an HEV. Vermutlich ist die CXCR3-CXCL9-Achse am Verbleib wie an der Diapedese in HEV von Lymphknoten beteiligt.

Kürzlich konnte Asselin-Paturel et al. zeigen, dass die Behandlung mit TLR7- und TLR9-Liganden wie auch eine Zytomegalie-Infektion zur Migration und zum *Cluster* von murinen PDCs in der Marginalzone der Milz führt, abhängig von Typ1-IFN-induzierten CXCR3-Liganden bei Inflammation. Zu einem späteren Zeitpunkt nimmt die Wanderungskapazität zu den CXCR3-Liganden hingegen ab. Interferon bewirkt außerdem die Hochregulation von CCR7 auf PDCs und ermöglicht somit die Wanderung zu dessen Liganden (Asselin-Paturel 2005). Trotz vieler Gemeinsamkeiten ist zu beachten, dass zwischen murinen und humanen PDCs Unterschiede bestehen und Aussagen aus Mausexperimenten nicht eins zu eins auf den Menschen übertragen werden dürfen. Im Gegensatz zu ihren humanen Pendanten exprimieren beispielsweise murine Monozyten und MDCs TLR9 und reagieren folglich direkt auf CpG-Stimulation (An 2002; Renshaw 2002).

2.1.3 Chemerin als Stimulus für unreife PDCs

Erst vor kurzem entdeckten unabhängige Forschergruppen (Vermi 2005; Zabel 2005) einen weiteren Rezeptor auf unreifen PDCs: ChemR23, der zu den *Serpentine*-Rezeptoren zählt, an G-Proteine koppelt und von unreifen MDCs und Makrophagen exprimiert wird. Sein Ligand Chemerin wurde selektiv in HEV sowie in Hautläsionen von Lupus erythematoses-Patienten detektiert und befähigt PDCs durch eine Endothelzellschicht hindurch zur Chemotaxis. Das Wanderungsverhalten der PDC erfolgt dosisabhängig, wobei deutlich weniger Zellen als bei der Spitzenkonzentration für SDF-1 angelockt werden. Chemerin-positive-Endothelzellen sind von ChemR23⁺-PDCs umgeben, was die Funktionalität dieses Rezeptors belegt.

Eine erhöhte Chemerinkonzentration konnte in Aszites bei Ovarialkarzinom-, in der Synovia bei Rheumatoider Arthritis- (Wittamer 2003) und in der Haut bei Psoriasis-Patienten gefunden werden. Wahrscheinlich stellt Chemerin ein weiteres wichtiges Signal für die PDC-Rekrutierung während entzündlicher und neoplastischer Prozesse

dar. Neben SDF-1/ CXCR4 konnte folglich ein neues Chemokin-Rezeptor-Paar für unreife PDCs identifiziert werden. Allerdings interagiert Chemerin im Gegensatz zu SDF-1 weder mit CXCR3- noch CXCR4-Liganden. In reifen PDCs wird ChemR23 entkoppelt und verliert dadurch seine Funktionalität, so dass wie bei SDF-1/ CXCR4 der Reifezustand der PDC ganz entscheidend ist.

2.1.4 Adenosin-vermittelte PDC-Migration

Normalerweise befinden sich unreife PDCs nicht in peripheren Geweben, vielmehr zirkulieren sie im Blut und wandern über hoch-endotheliale Venolen in Lymphknoten. Dieses Migrationsverhalten wird neben CXCR3 und CXCR4 über L-Selektin (CD62L) in HEV vermittelt und nimmt unter inflammatorischen Bedingungen im Lymphknoten und in nicht-lymphatischen Geweben zu (Yoneyama 2004; Cella 1999). Auch die Hochregulation von CCR7 im Rahmen der Aktivierung von PDCs ermöglicht ihre Wanderungskapazität von der Peripherie in den Lymphknoten zu steigern. Neben klassischen Chemokinen und ihren Kombinationen als Migrationsstimuli gibt es weitere chemotaktisch aktive Substanzen, die für die Wanderung von PDCs zu Entzündungsherden in peripheren Geweben relevant sind. Nach den vorgestellten Daten ist dafür Adenosin ein möglicher Kandidat, da an Entzündungsstellen Adenosingradienten gefunden wurden. Zudem stellt es einen potenten chemotaktischen Stimulus für andere Leukozyten-Populationen, darunter auch MonoDCs dar (Panther 2001). In der eigenen Arbeitsgruppe gab es zudem Vordaten zum chemotaktischen Verhalten von PDCs zu ATP. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass unreife PDCs zu Adenosin in Konzentrationen im niedrig-mikromolaren Bereich wandern. Eben diese Konzentrationen werden *in vivo* bei inflammatorischen Reaktionen gefunden. Adenosin induziert die Migration von PDCs auf ähnlich beeindruckende Weise wie SDF-1 (vergl. Ergebnisteil, Abb. 14 und 20).

Im physiologischen Kontext wird vermutlich eine Reihe von Faktoren gemeinsam zur beobachteten PDC-Migration beitragen. Dennoch ist es für ein tieferes Verständnis unabdingbar, zunächst *in vitro* einzelne Stimuli zu eruieren, um eine Basis für die Untersuchung des Zusammenspiels dieser Faktoren *in vivo* zu haben und auf diese Weise ein noch besseres Verständnis für die PDC-Migration zu erhalten.

2.1.5 Welche Chemokine produziert die stimulierte PDC?

Mikrobielle Stimuli oder CD40L aktivieren die im Blut zirkulierenden PDCs und bewirken ihr Ausreifen entsprechend der Expression von CD83, CD86 und CCR7. Anders als MDCs, die bereits im unstimulierten Zustand eine gewisse Menge der beiden homöostatischen Chemokine MDC und TARC produzieren, sind weder die genannten noch andere Chemokine in unstimulierten PDCs nachweisbar (Penna 2002a). Die Aktivierung mit verschiedenen Stimuli führt jedoch zur Produktion der pro-inflammatorischen Chemokine IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β und IP-10 (Penna 2002a; Krug 2002). Diese Aussagen bestätigen die Ergebnisse in dieser Arbeit. Erst die Stimulation mit CpG-ODN induzierte in der PDC eine deutliche Chemokinsekretion von IP-10 und MIP-1 α auf das Drei- bis Vierfache, vergleichbar für beide Oligonukleotid-Klassen. Der CCR5-Ligand Rantes ließ sich hingegen nur in ODN 2006-stimulierten PDCs auf knapp sechsfache Werte hochregulieren. Dies konnte zwar Krug, nicht jedoch Penna aufzeigen. Folglich ist zu postulieren: Oligonukleotide tragen zur Stimulation und Reifung von plasmazytoiden dendritischen Zellen bei und regen in diesem Zustand eine veränderte und vor allem stärkere Chemokinproduktion an. Es ist denkbar, dass die gesteigerte Zytokinsekretion (IFN- α , TNF- α) in CpG-stimulierten PDCs über einen autokrinen Feedback-Mechanismus zur Chemokinproduktion z. B. von IP-10 führt. Yoneyama wies erst kürzlich für MIG eine Abhängigkeit von TNF- α nach (Yoneyama 2004). Montoya zeigte eine Typ1-IFN-abhängige phänotypische und funktionelle Aktivierung muriner dendritischer Zellen (Montoya 2002).

Die Ergebnisse decken sich mit einer 2004 veröffentlichten Studie von Proietto et al. an Mäusen. Die Stimulation mit CpG führte zu einer entscheidenden Steigerung der inflammatorischen Chemokine MIP-1 α und MIP-1 β , die durch zusätzliche Gabe von IFN- γ nur noch leicht erhöht werden konnte. Die alleinige Gegenwart von IFN- γ brachte die PDC nicht zur Produktion der genannten inflammatorischen Chemokine. Die PDC war bezüglich der MIP-1 α/β -Sekretion allen Subpopulationen konventioneller dendritischer Zellen (cDC) weitaus überlegen. Auch Rantes wurde von den murinen PDCs nach ODN-Stimulation vermehrt produziert, jedoch nicht so stark wie von cDCs, wobei mittels Kostimulation mit IFN- γ die Sekretion nochmals mehr als verdoppelt werden konnte. Überraschenderweise stellten für alle DC-Populationen TLR7- und TLR9-Agonisten - und nicht etwa der TLR4-Agonist LPS für cDCs - den effektivsten Stimulus für die Chemokinsekretion dar.

Vergleichbar mit CpG-A sind virale Pathogene. Die Arbeitsgruppe um Fitzgerald-Bocarsly wies in beeindruckender Weise für Herpes-simplex-Virus-aktivierte humane PDCs die Hochregulation verschiedener Chemokine auf RNA-Ebene nach, darunter

MCP-1, die CCR5-Liganden MIP-1 α , MIP-1 β und Rantes sowie IP-10 (Megjugorac 2004). Auf Proteinebene konnten sie dies eindeutig für MIP-1 β und IP-10, sowie schwächer für MIP-1 α und Rantes mittels ELISA (enzymgekoppelter Immunsorptions-test) und Durchflusszytometrie verifizieren. Eine entscheidende Rolle spielt bei der Chemokin-Induktion die Endozytose der viralen Antigene, da die Unterbrechung dieses Weges die Antwort aufhebt. Hingegen war die Transkription viraler Gene nicht erforderlich. Für die Produktion der Chemokine MCP-1 und IP-10 könnte erneut - zumindest teilweise - ein autokriner Signalweg über IFN- α verantwortlich sein.

2.2 CpG-aktivierte PDCs als neuer Stimulus für PDCs

Plasmazytoiden dendritischen Zellen kommt eine Schlüsselposition im Rahmen von viralen Infektionen zu. CpG-Motive in viraler und bakterieller DNA werden vom Toll-like Rezeptor 9 erkannt, der nur von PDCs und B-Zellen exprimiert wird. Synthetische CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) verbessern das Überleben von PDCs und induzieren die Reifung und Aktivierung der Zellen. Auf der Suche nach neuen chemotaktischen Stimuli für die PDC, führte dieses Wissen zu der Überlegung, ob nicht sezernierte Stoffe aus CpG-stimulierten PDCs eine chemotaktische Wirkung auf die Zellen ausüben.

CpG-aktivierte PDCs zeigten eine hohe chemotaktische Aktivität für nicht-stimulierte PDCs auf. Dabei war die in PDCs induzierte chemotaktische Aktivität von CpG-A (= ODN 2216), das eine virale Infektion imitiert, stärker als diejenige von CpG-B (= ODN 2006); keines der beiden CpG-ODN besitzt per se eine chemotaktische Aktivität. Im Vergleich mit IL-3 generiertem PDC-Überstand, der bereits PDCs anlockte, wurde durch Stimulation mit ODN 2216 eine deutliche Steigerung der chemotaktischen Aktivität auf weitere PDCs erzielt.

Wahrscheinlich tragen die nach CpG-Stimulation vermehrt produzierten Chemokine IP-10, MIP-1 α und Rantes zusammen mit SDF-1 und anderen Faktoren wie z. B. auch Adenosin zu einer gesteigerten Migration bei. Es ist anzunehmen, dass CpG-Oligonukleotide PDCs zur Sekretion eines wahren „Stimulationscocktails“ anregen und die PDC darüber weitere Zellen ihrer eigenen Population anlockt. Um welche Faktoren es sich dabei im Einzelnen handelt, muss noch in weiteren Studien analysiert werden. Zahlreiche Untersuchungen über die Interaktion zwischen den DC-Subpopulationen sind in den vergangenen Jahren vorgestellt worden. In Abbildung 15B zeigt sich, dass auch LPS-stimulierte MDC-Überstände die Migration von PDCs positiv beeinflussen,

jedoch weitaus schwächer als die CpG-stimulierten PDC-Überstände. Auch wenn es bis dato noch keine Publikationen zur MDC-getriggerten PDC-Migration gibt, belegen doch verschiedene Quellen die CpG-induzierte Interaktion der beiden DC-Populationen. Blackwell und Krieg zeigten, dass die bekannte IFN- α -Produktion in CpG-A-stimulierten PDCs Monozyten zur IP-10-Sekretion anregt (Blackwell 2003). Vermutlich lässt sich dieser Effekt auf MDCs übertragen, die genauso wie Monozyten den Toll-like Rezeptor 9 nicht exprimieren und somit nicht direkt durch CpG stimuliert werden können, in Mischkulturen mit PDCs jedoch nach CpG-Stimulation IP-10 produzieren. Eine stärkere Wirkung von MDCs besteht wahrscheinlich auf reife PDCs, die über die Hochregulation von CCR7 zu dessen Liganden, MIP-3 β und 6CKine, wandern. Die CCR7-Liganden werden wiederum von reifenden MDCs, die in T-Zell-Zonen sekundärer lymphatischer Organe angesiedelt sind, produziert (Ngo 1998).

Da die Experimente mit PDC-Überstand nur eine Momentaufnahme zu einem bestimmten Zeitpunkt widerspiegeln, jedoch den zeitlichen Verlauf bezüglich Sekretion oder auch Elimination von chemotaktischen Stimuli unberücksichtigt lassen, wurde im Folgenden die Migration von PDCs zu lebenden PDCs untersucht. Das Ergebnis war ähnlich den zuvor gemachten Beobachtungen, nämlich dass PDCs von stimulierten PDCs angelockt werden. Überraschenderweise wurden bei dieser Versuchskonstellation bereits viele PDCs auch von den unstimulierten, nur mit IL-3 inkubierten PDCs angezogen. Außerdem war CpG-B CpG-A leicht überlegen. Der Unterschied könnte einerseits auf dem bereits angesprochenen unterschiedlichen zeitlichen Verlauf der Chemokinproduktion, entsprechend der zwei-stündigen Inkubationszeit, beruhen. Während dieser Zeit ist ein leicht verändertes Wanderungsverhalten der PDCs im Vergleich zu der Momentaufnahme bei Verwendung von Überständen durchaus denkbar. Andererseits - und dies ist der vermutlich entscheidendere Faktor - handelt es sich bei den oben eingesetzten PDCs nicht mehr um frisch isolierte Zellen. Durch die 18-stündige Inkubation mit IL-3, das zum Überleben eingesetzt wurde, erfolgt zumindest eine milde Ausreifung der Zellen, mit möglicherweise entsprechend veränderter Chemokinrezeptorexpression (Grouard 1997; Olweus 1997). Während des Reifungsprozesses erfolgt eine Herunterregulation von CXCR4 und Hochregulation von CCR7, dem Rezeptor von MIP-3 β und 6CKine. Für diese Chemokine konnte ein positives Migrationsverhalten von PDCs nachgewiesen werden (Krug 2002).

Die gezeigten Daten lassen erwarten, dass CpG-aktivierte PDCs eine entscheidende Rolle als chemotaktischer Stimulus für unreife wie auch reife PDCs aus dem Blut einnehmen. Die Daten lassen vermuten, dass Virus-stimulierte PDCs chemotaktische Stimuli wie Chemo- und Zytokine freisetzen, die zur weiteren Rekrutierung von PDCs

an den „Ort des Geschehens“ führen und sie erst danach in die T-Zell-Areale von lymphatischen Organen einwandern.

2.3 Unterschied von CpG-A und -B durch Interferon-*Priming* der PDC

Warum locken PDCs, die zuvor mit CpG-A stimuliert sind deutlich mehr PDCs an als die mit CpG-B stimulierten?

Eine mögliche Erklärung sind die großen Mengen der antiviralen Zytokine IFN- α/β (Typ1-IFN), die nur durch CpG-A induziert werden (Fitzgerald-Bocarsly 1993; Krug 2001) und eine virale Infektion vortäuschen. Über diesen indirekten Weg könnte die Chemokinsekretion, beispielsweise von IP-10, gesteigert werden. TNF- α , das in der PDC von CpG-B induziert wird, scheint hingegen von untergeordneter Bedeutung zu sein (Hemmi 2003; Kerkmann 2003).

Nach wie vor ist jedoch der genaue Grund für die unterschiedliche Wirkung von CpG-A und CpG-B auf PDCs, die über denselben Rezeptor (TLR9) vermittelt wird, nicht ganz verstanden. Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass für diesen Effekt das gegenseitige Anlocken von PDCs zu größeren Zellverbänden, das in dieser Arbeit gezeigt wird, eine wesentliche Rolle spielt.

Als IFN-*Priming* wird der Effekt bezeichnet, wenn Zellen nach Vorinkubation mit Typ I-IFN auf TLR-Stimulation deutlich größere Mengen an IFN- α produzieren als nach Stimulation ohne vorhergehende Aktivierung (Toth 1985; Siren 2005). Es konnte aufgezeigt werden, dass CpG-B in der PDC nach Vorinkubation mit extrem kleinen Mengen an IFN- β ähnlich große Mengen an IFN- α induziert wie CpG-A (Hornung, unveröffentlichte Daten). Dieser Effekt erwies sich als abhängig von einem funktionierenden Typ1-IFN-Rezeptor und ging mit einer verstärkten Expression des Adaptermoleküls IRF-7 einher. Ebenso induzierte die Stimulation mit sehr geringen Konzentrationen an CpG-B eine stärkere und in ihrem zeitlichen Ablauf verzögerte IFN- α -Produktion als hohe Konzentrationen. Eine weitere sehr interessante Beobachtung ist, dass eine starke IFN- α -Induktion durch CpG-A erst ab einer gewissen Dichte an kultivierten PDCs zu erreichen war.

Aufbauend auf diesen Ergebnisse wurde die Hypothese entwickelt, die Grundlage einer starken IFN- α -Produktion, wie sie durch CpG-A in der PDC induziert wird, sei die Folge eine TLR9-Aktivierung in mit Typ1-IFN vorstimulierten Zellen; sie stellt damit das Ergebnis des Zusammenspiels direkter TLR-Aktivierung und para- bzw. autokriner Vorinkubation in einer Zellpopulation dar und kann auf Ebene einer isolierten Zelle

höchstens durch externe Zugabe von Typ1-IFN ablaufen. Durch die schnelle und simultane Aktivierung einer Zellpopulation durch CpG-B kann eine Vorstimulation noch nicht aktivierter Zellen durch parakrines IFN nicht ablaufen. Durch den verzögerten und wenig synchronisierten Ablauf der IFN- α -Induktion durch das von der Struktur her partikuläre CpG-A (Honda 2005) wird diese gegenseitige Beeinflussung der Zellen möglich. Für das Verständnis der CpG-Stimulation ist es somit ganz entscheidend, die PDC im Zellverband mehrerer Zellen bzw. in ihrer Population und nicht als Einzelzelle zu betrachten. Damit das gegenseitige *Priming* aber überhaupt stattfinden kann, müssen die im Blut zirkulierenden PDCs zusammen kommen und sich folglich gegenseitig anlocken.

2.4 Die Interaktion zwischen stimulierten PDCs und T-Helfer-Zellen

PDCs interagieren im Rahmen einer antiviralen Immunantwort über ihre Typ1-IFN-Produktion mit verschiedenen anderen Immunzellen wie NK-, B-, T-Zellen und MDCs. So können sie auf einzigartige Weise angeborene mit erworbener Immunität verbinden.

Seit einigen Jahren ist die Typ1-IFN-vermittelte-Wirkung der PDC auf T-Zellen bekannt. Sie induziert frühe Aktivierungsmarker wie CD69, ein Langzeit-Überleben der T-Zellen, die IFN- γ -Produktion und Th1-Differenzierung (Agnello 2003). CpG-Oligonukleotide fungieren dabei als wirkungsvoller Stimulus. Erst kürzlich gelang es Moseman aufzuzeigen, dass CpG-stimulierte PDCs die Differenzierung von naiven T-Zellen in regulatorische T-Zellen *primen* (Moseman 2004). Influenzavirus-exponierte PDCs induzieren die Expansion von spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten und T(Helfer)h1-Zellen (Fonteneau 2003). Ein Jahr später präsentierte Fonteneau die Th1-Polarisierung für HIV-aktivierte PDCs (Fonteneau 2004). Zum aktuellen Zeitpunkt ist die Datenlage bezüglich der Interaktion von PDCs und T-Zellen somit sehr vielschichtig, zum Teil sogar widersprüchlich; ob PDCs überwiegend regulatorische oder zytotoxische T-Zellen *primen* und ob sie naive CD4⁺ T-Zellen eher in Richtung Th1 oder Th2 *schiften*, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Wofür die PDC in diesem Zusammenhang nun wirklich verantwortlich ist, muss anhand weiterer Versuche geklärt werden.

Die Differenzierung von B-Zellen zu Antigen-produzierenden Plasmazellen mittels PDCs und T-Helfer-Zellen ist bekannt (Jego 2003). Mittlerweile gelang Poeck et al. sogar der Nachweis, dass die Ausdifferenzierung von B-Zellen durch CpG-stimulierte PDCs ohne T-Zell-Hilfe möglich ist. (Poeck 2004). Die bevorzugte IgG- statt IgM-Sekretion lässt ein *Schiften* in Richtung Gedächtnis-B-Zellen vermuten.

Cooper et al. belegte den wechselseitigen Dialog von DCs und NK-Zellen (Cooper 2004), der die Aktivierung und Zytokinproduktion beider Zellarten zur Folge hat. Aktivierende Signale werden über IL-12 und IFN- γ (Yu 2001) sowie über den direkten Zellkontakt zwischen DCs und NK-Zellen vermittelt (Gerosa 2002). Die Freisetzung von Typ1-IFN aus PDCs führt einerseits zur Aktivierung der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen, andererseits werden nicht-infizierte Zellen vor der NK-Zell-Lyse geschützt. Anhand von Mausversuchen konnten unabhängige Forschergruppen zeigen, dass erstens eine Zytomegalievirus-Infektion PDCs via TLR9 aktiviert, zweitens über die IFN- α - und IL-12-Sekretion die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität erhöht, drittens zur IFN- γ -Produktion führt und viertens *in vivo* eine frühe antivirale Reaktion erzeugt (Krug 2004; Dalod 2003).

Das Migrationsverhalten einer Zellpopulation zu einer anderen - Voraussetzung für die erfolgreiche direkte oder indirekte Interaktion - ist bisher kaum untersucht worden. In Chemotaxisversuchen mit PBMCs konnte gezeigt werden, dass überwiegend CD4⁺ T-Zellen und nicht CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen oder Monozyten zu PDCs wanderten. Weitere Untersuchungen ergaben, dass es sich hierbei vor allem um naive CD4⁺ T-Zellen handelte. Dies ist nahe liegend, da die Interaktion zwischen PDCs und naiven T-Zellen in T-Zell-Zonen von Lymphknoten besonders eng ist. Dorthin wandern PDCs nach Antigenkontakt, vermittelt über Chemokine und Adhäsionsmoleküle. In den parakortikalen Bereichen, in denen vorwiegend T-Zellen lokalisiert sind, erfolgt die Antigenpräsentation über Peptid-MHC-Komplexe auf PDCs, wodurch, zusammen mit kostimulatorischen Molekülen, die Aktivierung und Ausreifung naiver T-Zellen induziert wird. Die weitere Differenzierung der naiven CD4⁺ T-Zellen in Th1- und Th2-Zellen erbrachte keinen klaren Unterschied im migratorischen Verhalten der beiden Subpopulationen zu PDCs, wobei Th1-Zellen eine Tendenz zu ODN2006-stimulierten PDCs zeigen. LPS-stimulierte MDCs scheinen hingegen mehr Th2-Zellen anzulocken. Dies stützt die Behauptung, PDCs würden bei Abwesenheit von CpG eine Th2-, bei Anwesenheit von CpG hingegen eine Th1-Antwort initiieren, weshalb PDCs auch als DC2 bezeichnet werden.

Reife PDCs wie auch MDCs exprimieren nach Antigenaufnahme den Chemokinrezeptor CCR7, der es ihnen ermöglicht, in sekundäre lymphatische Organe zu wandern. Dort erfolgt über die Interaktion mit T-Zellen die vollständige Ausreifung zu Antigen-präsentierenden-Zellen (APCs), die in der Folge zur Aktivierung naiver Zellen und Gedächtnis-T-Zellen als Teil der adaptiven Immunantwort beitragen. MDCs und PDCs können sowohl eine Th1- als auch eine Th2-Antwort induzieren. PDCs begünstigen die T-Zell-Entwicklung auf folgende Weise: Virus-stimulierte reife PDCs bewirken in naiven CD4⁺ T-Zellen überwiegend die *Schiftung* in Richtung Th1-Zellen,

mit IL-3 und CD40L gereifte PDCs induzieren verstärkt die Bildung von Th2-Zellen (siehe auch Einleitung, Kap. 4.4.2). Die PDC-Stimulation mit CpG-ODN steigert über die Produktion von Typ1-IFN die Expression von Chemokinrezeptoren wie CCR5 und CXCR3 auf aktivierten T-Zellen (Sallusto 1998; Lande 2003; Langenkamp 2003). Dies entspricht einer Th1-Polarisierung. Zugleich induziert die CpG-Stimulation in PDCs die gesteigerte Produktion der CCR5-Liganden MIP-1 α und Rantes sowie des CXCR3-Liganden IP-10.

Vergleichbare Experimente führte Megjugorac durch. Er untersuchte in Chemotaxisassays mit viral stimulierten PDCs die funktionelle Rolle der Chemokine MIP-1 α und IP-10 (Megjugorac 2004). Er beschreibt, dass überwiegend aktivierte T- und NK-Zellen zu Virus-aktivierten PDCs wandern, nicht jedoch naive T-Zellen. Zur Aktivierung der T-Zellen wurden diese eine Woche lang mit PHA (Phytohemagglutinin) und IL-2 kultiviert. Die Migration wurde durch die Addition von neutralisierenden Antikörpern gegen MIP-1 β und IP-10 inhibiert. Im Gegensatz dazu riefen Überstände von unstimulierten PDCs einen vierfachen Anstieg der gewanderten, naiven T-Zellen im Vergleich zu Medium hervor. Möglicherweise zeigt das veränderte Migrationsmuster den Wechsel eines homöostatischen zu einem aktivierten Zustand an. Die normale Lymphozyten-Wanderung in sekundäre lymphatische Organe kann - so die Annahme - durch residierende PDCs stark beeinflusst werden und während viraler Stimulation eine Veränderung der nun aktivierten Effektorzellen zu stimulierten PDCs an den Ort der Entzündung erfahren.

Megjugorac formulierte folgende Hypothese: Die viral induzierte IFN- α - und Chemokinproduktion in PDCs spielt eine zentrale Rolle für das *homing* von Leukozyten zu PDCs, gefolgt von der Leukozyten-Aktivierung, was eine effektive antivirale Immunantwort ermöglicht. Wieso jedoch bei Megjugorac naive T-Zellen nicht so ausgiebig zu stimulierten PDC-Überständen wanderten, bleibt unklar. Auch ob es sich bei den aktivierten T-Zellen um Th1- oder Th2-Zellen handelte, wurde nicht beantwortet. Eine Ursache könnte in dem unterschiedlich gewählten Stimulus liegen. Megjugorac wählte Herpes simplex-Virus im Vergleich zu CpG-Oligonukleotiden. ODN 2216, das eine virale Infektion imitiert, lockte ebenfalls kaum Th1-Zellen an, wohingegen sich ODN 2006 als etwas effektiverer Stimulus erwies.

Die selektive Rekrutierung von Effektorzellen durch die PDC hat auch Bendriss-Vermare et al. untersucht. Interessanterweise zeigte sich die Art der Stimulation sowohl für das induzierte Chemokinprofil als auch für die dadurch angelockte Zellpopulation entscheidend. Die PDC-Gewinnung erfolgte hier nicht aus dem peripheren Blut, sondern aus den Tonsillen, was einem anderen Reifezustand der PDC entspricht. Laut ihrer Ergebnisse locken mit CD40L stimulierte PDCs preferenziell

regulatorische T-Zellen an, während Virus-stimulierte PDCs übereinstimmend mit den hier gezeigten Daten vorrangig Th1-Zellen anziehen (Bendriss-Vermare 2005). Für MonoDCs hatte Iellem et al. bereits 2001 nachweisen können, dass sie regulatorische CD4⁺ T-Zellen anlocken.

Entscheidend für das migratorische Verhalten von Th1-Zellen zu PDCs sind die IFN- γ -Produktion und die hohe Expression von CXCR3, CCR4 und CCR5 auf diesen T-Zellen, deren Liganden wie oben erläutert von aktivierten PDCs produziert werden. All diese Beobachtungen sprechen für eine gewisse Plastizität der PDC, unter bestimmten Bedingungen auf die jeweils benötigten T-Zellen Einfluss zu nehmen. Dabei können wahrscheinlich diskrete Unterschiede, sei es in der Art des Stimulus oder bezüglich des Reifezustandes der PDC, dazu führen, dass andere T-Zell-Subpopulationen angelockt werden.

2.5 Adenosin als Modulator der PDC-Antwort

2.5.1 Adenosinrezeptor-Expression auf PDCs entsprechend ihres Reifegrades

Adenosin wird kontinuierlich in Zellen gebildet und tritt über bidirektionale Transporter in den extrazellulären Raum aus. Zudem entsteht Adenosin über den Abbau von Adenin-Nukleotiden durch Ektonukleotidasen (Fredholm 2001). In der Umgebung eines lokalen Entzündungsgeschehens kann die Kombination von erhöhter intrazellulärer Adenosinproduktion durch gestresste Zellen und die Freisetzung von Adenin-Nukleotiden durch aktivierte oder beschädigte Zellen einen 150-fachen Anstieg der Adenosinkonzentration im Gewebe mit Werten bis zu 30 μ M verursachen (Van Belle 1987; Pedata 2001). Studien *in vitro* wie auch *in vivo* lieferten Beweise, dass Adenosin über die Aktivierung von Adenosinrezeptoren, die auf Leukozyten exprimiert werden, als Modulator bei Entzündungsreaktionen fungiert (Cronstein 1994). Für MDCs gelang der Beweis für das Vorhandensein dieser Rezeptoren auf mRNA-Ebene bereits vor einigen Jahren (Panther 2001). Da plasmazytoide dendritische Zellen eine zentrale Rolle in der Regulation von Immunantworten bei viralen Infektionen, Autoimmunerkrankungen und Tumoren spielen, war es nahe liegend, die Adenosinrezeptor-expression auch auf dieser Zellpopulation sowie die Funktion von Adenosin auf PDCs zu untersuchen.

Unreife PDCs exprimieren den A₁- und niedrige Level des A_{2a}-Rezeptors. Sie unterscheiden sich diesbezüglich von *in vitro* gereiften mononukleären DCs (MonoDCs), die den A₁-, A_{2a}- und A₃-Rezeptor exprimieren und ihre Signale hauptsächlich über den A₃-Rezeptor erhalten (Panther 2001; Fossetta 2003).

Interessanterweise ähnelt sich das Adenosinrezeptormuster von PDCs und CD11c⁺ DCs (= MDCs) und unterstreicht somit die Unterschiede von physiologischen MDCs, die im Blut zirkulieren und *in vitro* gereiften MonoDCs (M. Schnurr, unveröffentlichte Daten). Die Ausreifung und Aktivierung der PDC in Kultur mit IL-3 und CD40L verändert ihr Rezeptormuster sehr schnell: der A₁-Rezeptor wird herunter-, der A_{2a}-Rezeptor hochreguliert. Vergleichbare Ergebnisse bei der Rezeptorregulation hatte Fossetta et al. für LPS-gereifte MonoDCs erhalten. Während sich unreife DC-Typen in ihrem Expressionsmuster unterscheiden, lässt sich der A_{2a}-Rezeptor auf allen reifen dendritischen Zellen nachweisen (Fossetta 2003).

2.5.2 A₁-Rezeptor-gesteuerte Migration unreifer PDCs zu Adenosin

Wie bereits unter 2.1.4 dargelegt, stellt Adenosin auch einen weiteren starken chemotaktischen Stimulus für unreife PDCs dar. Vermittelt wird diese Wanderungsfähigkeit über den A₁-Rezeptor, den dominanten Subtyp unter den verschiedenen Adenosinrezeptoren auf unreifen PDCs. Schnurr et al. (2004) konnte dies belegen, indem er das chemotaktische Verhalten der PDC auf Adenosinrezeptor-Agonisten hin untersuchte und eine Migration lediglich auf A₁-, nicht jedoch auf A_{2a}- oder A₃-Rezeptor-Agonisten erfolgte. Entsprechend dieser Beobachtung konnte nur durch Zugabe eines A₁-Rezeptor-Antagonisten das chemotaktische Verhalten der PDCs zu Adenosin unterbunden werden. Da die Signalkaskade des A₁- und A₃-Rezeptors über die Phospholipase C vermittelt wird und zur Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern führt, konnte übereinstimmend mit den Migrationsassays auch auf intrazellulärer Ebene ein Kalziumflux nur nach Bindung des A₁-Rezeptor-Agonisten beobachtet werden. Dies verdeutlicht die Rolle dieses Rezeptors für die Rekrutierung unreifer PDCs zu Entzündungsorten. In Kontrast dazu verlieren reife PDCs ihre chemotaktische Fähigkeit zu Adenosin entsprechend der Herunterregulation des A₁-Rezeptors.

2.5.3 Die PDC als IL-12-Produzent?

Krug et al. gelang es, die PDC als IL-12-Quelle zu identifizieren, wenn diese in der Gegenwart von IL-3 mehrere Tage lang mit ODN 2006 und CD40L stimuliert wurde (Krug 2001b). In der vorliegenden Arbeit wurde in äquivalenten PDC-Kulturen nach Stimulation mit CD40L und CpG-ODN IL-12 gemessen. Dieses Ergebnis ist nach wie vor in der Literatur umstritten, da die IL-12-Produktion klassischerweise der MDC und nicht der PDC zugeschrieben wird. So schreibt Liu dies der verunreinigenden CD11c⁺

MDC-Population innerhalb der PDCs zu (Liu 2005). Duramad et al. bestätigte Lius Ergebnis dahingehend, dass keine Zelle in der Lage ist, beide Zytokine, also IFN- α und IL-12, zugleich zu produzieren (Duramad 2003).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Aufreinigung der PDCs mittels magnetischer Zellseparation (MACS) mit Anti-BDCA-4-Mikropartikeln (BDCA-4-Kit), der aktuell am häufigsten verwendeten Isolationsmethode. Die Reinheit der einzelnen Spender lag meist weit über 90 % (vergl. Abb. 9), so dass von keiner größeren Verunreinigung auszugehen ist, die die Versuche hätten verändern oder beeinträchtigen können.

Dennoch gibt es in letzter Zeit zunehmend kritische Stimmen bezüglich dieses Aufreinigungsverfahrens. Die Arbeitsgruppe um Liu bevorzugt die PDC-Sortierung als CD4⁺ CD11c⁻ Lin⁻ Zelle mittels dreifarbigiger Immunfluoreszenz (Liu 2005), da sie ihrer Meinung nach zu höherer Reinheit mit > 99 % ohne funktionelle Beeinträchtigung führt. Jedoch ist nicht außer Acht zu lassen, dass diese Methode die ohnehin labilen PDCs weitaus stärker angreift als die magnetische Zellseparation. Gerade bei den hier durchgeführten Chemotaxis-Experimenten wurden die frisch aufgereinigten PDCs meist sofort in die Transwellplatten eingesetzt und konnten sich nicht erst mehrere Tage in Kultur „erholen“. Ein weiterer Vergleich dieser und anderer (MACS mit BDCA-2-Kit, Immunfluoreszenz-Sortierung der CD123^{high} HLA-DR⁺ Lin⁻ Zelle), vielleicht auch ganz neuer Verfahren, wird hoffentlich mehr Klarheit bringen.

Lius Aussage erscheint nur auf den ersten Blick einleuchtend. Denn CpG-Oligonukleotide, egal welcher Klasse, binden an TLR9, der außer auf PDCs nur noch auf B-Zellen exprimiert wird (Hemmi 2000; Hornung 2002). Es ist folglich unklar, wie MDCs durch CpG-ODN zur IL-12 Produktion angeregt werden.

Vermutlich lässt sich dieses Phänomen nur über die Interaktion der beiden DC-Subpopulationen erklären: CpG-B induziert in der PDC ihre Ausreifung, erkennbar an der Expression von Oberflächenmolekülen, sowie die Produktion einiger Zytokine wie TNF- α und in geringer Menge auch IFN- α . Zusammen mit CD40L können diese Zytokine die MDC zur IL-12-Produktion aktivieren. Experimente mit Mäusen zeigen, dass der Effekt von Typ1-IFN auf die IL-12-Produktion recht paradox ausfällt: während hohe IFN-Level die Transkription der IL-12p40-Kette vermindern, sind niedrige Level für die Transkription des IL-12p35-Gens notwendig (Dalod 2002; Gautier 2005). Für eine endgültige Klärung, ist es unumgänglich, weitere Studien bezüglich der genauen Zytokinproduktion in PDCs und MDCs durchzuführen.

2.5.4 A_{2a}-Rezeptor-vermittelte Modulation der Zytokinproduktion in PDCs

Inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α und IFN- α stellen eine zentrale Bedeutung für die Abwehr eindringender Pathogene dar. Besonders über die frühe Interferon-Produktion ist die PDC ganz entscheidend an der initialen Abwehr viraler wie auch systemischer Infektionen beteiligt. Als Antwort auf eine Virusinfektion oder Stimulation mit CpG-ODN produziert die PDC große Mengen an IFN- α sowie geringere Mengen an IL-6, IL-12 und TNF- α (Kadowaki 2000; Krug 2001a; Bauer 2001).

In vitro wie auch *in vivo* übt Adenosin eine inhibierende Funktion auf die Zytokinproduktion aus. Dies erfolgt über den cAMP-Anstieg, nach der Bindung von Adenosin an den A_{2A}-Rezeptor (Panther 2003; Ohta 2001). Entsprechend des Stimulationsprotokolls von Krug et al. wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt der Adenosinexposition auf die Zytokinproduktion in unreifen und reifen PDCs untersucht. Die Stimulation der PDCs erfolgte mit CpG-B (ODN 2006) und CD40L. Adenosin bewirkte keine Veränderung in der IL-6-, IL-12- und IFN- α -Produktion unreifer PDCs, die überwiegend den A₁-Rezeptor exprimieren. Jedoch wurde die Produktion der genannten Zytokine signifikant in den PDCs inhibiert, die für 60 Stunden mit IL-3 inkubiert waren, bevor sie mit ODN 2006 und CD40L stimuliert wurden. Diese PDCs exprimieren vorwiegend den A_{2a}-Rezeptor. Über diesen Rezeptortyp könnte Adenosin *in vivo* eine regulierende Funktion in Bezug auf die Zytokinfreisetzung bzw. deren Produktion ausüben.

Wie beschrieben kommt es auf reifen PDCs zum Herunterregulieren des A₁-Rezeptors und dadurch zu einem deutlich verminderten Migrationsverhalten der PDCs auf Adenosin, im Gegensatz dazu erfolgt ein Hochregulieren des A_{2a}-Rezeptors auf mRNA-Ebene. Der A_{2a}-Rezeptor koppelt an die Adenylatzyklase und führt zu einer vermehrten Bildung des *second messengers* cAMP, der nach Adenosingabe in CD40L-aktivierten PDCs deutlich höhere Level als in unreifen PDCs erreicht (Schnurr 2004). Mittels eines kompetitiven cAMP-Inhibitors kann die verminderte Zytokinproduktion in stimulierten Monozyten dosisabhängig wieder gesteigert werden (Link 2000), so dass bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Signaltransduktion die Weichen für die Zytokinproduktion gestellt werden. Die Blockade des cAMP-Abbaus über die Phosphodiesterase führt erneut zu einer verminderten IL-12-Produktion.

Zusammenfassend lässt sich eine duale Rolle für Adenosin auf die Funktion der plasmazytoiden dendritischen Zelle vermuten. Adenosin aktiviert in unreifen PDCs den A₁-Rezeptor und induziert dadurch Chemotaxis, was initial zur Rekrutierung von PDCs an Entzündungsstellen führt. Dort treffen PDCs auf Pathogene, die ihrerseits die PDC-Ausreifung mit nachfolgender Zytokinproduktion initiieren. Dadurch konditionieren sie

ihr Umfeld und interagieren sowohl mit unreifen als auch Antigen-spezifischen Effektorzellen. Reife PDCs erfahren einen Rezeptorwechsel vom A_1 - zum A_{2a} -Rezeptor. Dies sensibilisiert sie für den anti-inflammatorischen Effekt von Adenosin über den A_{2a} -Rezeptor-vermittelten cAMP-Anstieg, indem die Kapazität zur Zytokinproduktion in reifen PDCs inhibiert wird. Adenosin lockt die Zellen zwar an den „Ort des Geschehens“, verhindert aber zugleich eine inadäquat hohe bzw. chronische Zellaktivierung und damit einhergehend mögliche schädliche Auswirkungen bis hin zu Krankheiten.

In Abbildung 24 sind schematisch die Reaktionsmuster der PDC dargestellt. Welcher chemotaktische Stimulus die PDC gerade anlockt, ist vor allem von ihrem Reifestadium abhängig. Dennoch wird *in vivo* das exakte Ausmaß einer Immunreaktion sicherlich von dem Zusammenspiel vieler Faktoren beeinflusst. Dieses im Detail zu charakterisieren, stellt eine Herausforderung für die nächsten Jahre dar.

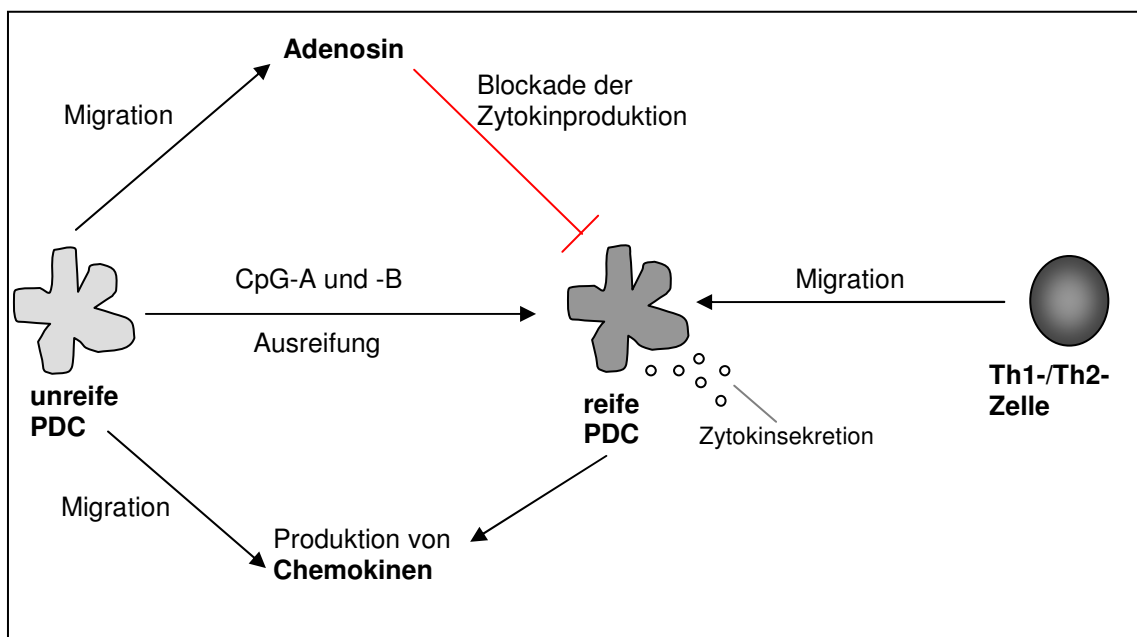


Abb. 24: Die Reaktionsmuster der PDC in Abhängigkeit von ihrem Reifezustand. Wirkung von CpG-Oligonukleotiden, Chemokinen und Adenosin sowie Interaktion mit Th1-/Th2-Zellen

3 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein besseres Verständnis für das chemotaktische Verhalten humaner plasmazytoider dendritischer Zellen *in vitro* zu erhalten. Die Interaktion von PDCs mit Chemokinen wie auch mit einer Vielzahl weiterer chemotaktischer Stimuli ist wichtig für ihre normale Funktion. Darüber hinaus gibt es eine beträchtliche Anzahl weiterer Moleküle und Immunzellen, die die PDC-Migration modulieren. Noch fehlt für einige ein umfassendes Wissen bezüglich ihres Wirkungsspektrums. Detaillierte Kenntnisse der Mechanismen, die die Migration regeln, sollten es ermöglichen, die Funktion von PDCs in verschiedenen pathologischen Situationen zu kontrollieren. Diese sind durch eine verminderte Aktivität, wie bei Neoplasien und bei bestimmten chronischen Virusinfektionen, oder durch eine mitunter überschießende Aktivität dieser Zellen, wie bei Autoimmunerkrankungen, charakterisiert. Somit könnte die pharmakologische Kontrolle der PDC-Migration eine neue Richtung bei der Strategie therapeutischer Interventionen repräsentieren. Im Folgenden wird dies anhand einiger Beispiele verdeutlicht.

- Die PDC in der Anti-Tumor-Therapie

PDCs als natürliches Adjuvans in einer Anti-Tumor-Vakzine einzusetzen, ist von großem Interesse. Bereits bei verschiedenen Tumorerkrankungen wurden erhöhte PDC-Zahlen festgestellt, jedoch handelt es sich häufig um unreife PDCs, deren Ausreifung durch inhibierende Faktoren von den Tumorzellen unterbunden wird, vermutlich über TGF- β (transformierender Wachstumsfaktor β), VEGF- β (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor β), IL-10 und die verminderte Expression spezifischer TLRs wie TLR9. Die entscheidende Aufgabe besteht darin, reife, funktionsfähige PDCs an den „Ort des Geschehens“ zu locken. So korreliert beispielsweise bei Patientinnen mit Mammakarzinom eine hohe Anzahl unreifer CD123⁺ PDCs mit einem erhöhten Risiko für eine Tumordissemination sowie mit einem Rückfall (Treilleux 2004).

PDCs sind folglich gut als Targetzellen in der Tumorthherapie geeignet, da sie nach Ausreifung zur Tumorsuppression beitragen und so die Prognose verbessern können. Sie stellen eine interessante Alternative bzw. Ergänzung zu den oft sehr invasiven bzw. den Organismus äußerst belastenden Eingriffen in Form von radikalen Operationen oder Radio-Chemotherapien dar. Dabei spielen verschiedene Ansatzpunkte eine Rolle. Eine Therapie mit den in dieser Arbeit vorgestellten CpG-Oligonukleotiden als Stimulans kann beispielsweise eine

spezifische Immunantwort auslösen oder positiv verstärken und somit Einfluss auf das Auftreten wie auch auf das Größenwachstum von bestimmten Tumoren nehmen. Erst vor kurzem konnte Pilon-Thomas et al. in einem murinen Melanommodell die Effizienz einer adjuvanten CpG-Immuntherapie in Kombination mit dendritischen Zellen zeigen (Pilon-Thomas 2006). Mäuse, die mit CpG und Antigen-stimulierten dendritischen Zellen vakziniert waren, entwickelten einen Langzeitschutz gegenüber Malignem Melanom. Dies korreliert mit einer gesteigerten Antigen-spezifischen T-Zell-Immunantwort, die die Wissenschaftler zuvor *in vitro* für CpG-gereifte dendritische Zellen nachgewiesen hatten.

Plasmazytoide dendritische Zellen *primen* naive Melanom-spezifische CD8⁺ Lymphozyten zur IFN γ -Sekretion *in vitro* und reichern sich in primären Hautläsionen bei Malignem Melanom an (Salio 2003). CD40L-stimulierte PDCs induzieren in diesen T-Zellen die Expression von Oberflächenmolekülen wie CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*) und L-Selektin, die die Migration von Effektorzellen zu entzündlichen Hautläsionen ermöglichen. Außerdem wurden PDCs peritumoral in den meisten primären Melanomen *in vivo* gefunden. Typ1-IFN in Überständen von PDCs erhöht die Expression von CD95, MHC-I und MHC-II auf Tumorzellen, ein Zeichen für die immunmodulierende Rolle der PDC, die eine Tumor-spezifische T-Zell-Antwort *primen* und die Tumorgroße über die Sekretion löslicher Faktoren beeinflussen.

Auch in epitheliale Ovarialzellkarzinom wurden PDCs in großer Zahl gefunden, die unfähig waren, T-Zellen zu aktivieren. Stattdessen induzierten sie die Sekretion von IL-10 in regulatorischen T-Zellen (Zou 2001; Hartmann 2003). Die Migration der PDCs zum Tumor erfolgt im Ovarialkarzinom über SDF-1, der in peritumoralen Stroma- und Endothelzellen detektiert wurde. Die direkte Injektion von CpG-ODN in den Tumor führte zu einer Größenreduktion. Bei simultaner Gabe mit MDCs konnten sogar Chemotherapie-resistente Tumore erfolgreich behandelt werden (Lonsdorf 2003). Die Autoren mutmaßen, dass PDCs in Tumor-drainierenden Lymphknoten Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO) produzieren. IDO führt zum Abbau von Tryptophan, das an der Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen entscheidend beteiligt ist (Hayashi 2004; Mellor 2004) und auf diese Weise lokal ein Umfeld kreiert, das wirtseigene antitumorale T-Zell-Antworten unterdrückt (Munn 2004). Es ist nicht geklärt, ob IDO in diesem Fall wirklich von PDCs oder eher von einer anderen Zellpopulation produziert wird. Je nach Applikationsort kann CpG nicht nur einen immunstimulatorischen (lokale Anwendung), sondern auch einen inhibierenden Effekt (systemische Gabe) auf die T-Zell-Expansion und auf die Aktivität zytotoxischer T-Zellen ausüben (Wingender 2006). Vermittelt wird dies

über die Induktion von IDO, ist abhängig von TLR9- und unabhängig von IFN- α /- γ -Stimulation. So könnten auch unerwünschte oder überschießende T-Zell-Antworten reduziert werden, wie für Asthma bronchiale an einem Mausmodell aufgezeigt werden konnte (Hayashi 2004).

Vermutlich sind PDCs in Tumoren unfähig, antitumorale Immunantworten zu induzieren, sondern regen stattdessen T_{reg}-Zellen an. Es ist möglich, dass Tumorzellen zur Dysregulation einer potenten Immunantwort beitragen, indem sie die Aktivierungsfähigkeit von PDCs manipulieren und die Akkumulation von MDCs blockieren. Vorstellbar ist ferner, dass über eine CpG-induzierte TLR-Aktivierung die Funktion von T_{reg}-Zellen aufgehoben und darüber das suppressive Tumormilieu verändert wird. Auch eine anti-angiogenetische Wirkung ist denkbar, wodurch zumindest das rasche Wachstum unterbunden werden kann. Eine Studie mit Mäusen hat bereits gezeigt, dass die Stimulation von PDCs durch Imidazoquinolin (Imiquimod), ein TLR7/-8-Agonist, eine Tumorregression bei Malignem Melanom induziert (Palamara 2004). Die CpG- oder LPS-induzierte Aktivierung von TLRs blockiert über die Produktion von IL-6 in DCs den suppressiven Effekt von T_{reg}-Zellen (CD4⁺ CD25⁺) und ermöglicht die Aktivierung einer pathogen-spezifischen adaptiven Immunantwort (Pasare 2003).

- Die PDC und chronische Viruserkrankungen

Ein ähnlicher Therapieansatz ist bei HIV-infizierten Patienten denkbar, nämlich die Verabreichung von PDC-stimulierenden Agenzien, wie den CpG-Oligonukleotiden, oder der Transfer von *ex vivo* stimulierten PDCs. Der Nachweis von HIVp24-Antigen in PDCs HIV-infizierter Patienten deutet darauf hin, dass PDCs von HIV infiziert werden (Fong 2002). Die Zahl der zirkulierenden PDCs reduziert sich deutlich im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung (vergl. Einleitung, Kap. 4.7). Der Verlust zirkulierender PDCs korreliert mit einer hohen Viruslast und dem vermehrten Auftreten opportunistischer Erkrankungen wie dem Kaposi-Sarkom. Erst vor kurzem konnte aufgezeigt werden, dass HIV-infizierte Zellen die IFN-Produktion, die Reifung und die Migration in PDCs induzieren (Schmidt 2005). Durch die Abwanderung in befallene Lymphknoten kann so der Zellverlust im Blut erklärt werden, was sich durch Stimulation mit CpG reduzieren ließe.

- Die PDC bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises

Ein anderer Ansatzpunkt könnte bei rheumatischen Erkrankungen eine Rolle spielen. Neben einer CpG-vermittelten Ausreifung der PDCs steht hier die Suppression einer überschießenden Zyto- und Interleukinproduktion aus unreifen PDCs im Vordergrund, wie sie durch den Einsatz von Adenosin-Agonisten erreicht werden kann. Die Synovialflüssigkeit von Patienten mit Rheumatoider Arthritis oder Arthritis psoriatica enthält die Chemokine IP-10, I-TAC und SDF-1, die zur Chemotaxis von PDCs führen. Die Patienten weisen folglich wesentlich höhere PDC-Zahlen in der Synovia auf als z. B. Patienten mit Arthrose (Lande 2004). Die morphologische und immunphänotypische Charakterisierung ergab, dass es sich um unreife PDCs handelte, vermutlich aufgrund inhibitorischer Faktoren in der Synovia. Die Ausreifung ließ sich *ex vivo* durch Exposition eines viralen Antigens oder CpG-DNA induzieren. Die Chemokin-geleitete Rekrutierung der PDC aus dem Blut in die Synovia ist wichtig für die Regulation der Immunantwort bei chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen. Möglicherweise sind die PDCs auch an der Aufrechterhaltung immunpathologischer Veränderungen beteiligt, die diesem Formenkreis an Erkrankungen zugrunde liegen. Nur die reife PDC ist befähigt, Gedächtnis-T-Zellen zu aktivieren und die Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-sezernierende Plasmazellen zu fördern. Die bereits erwähnte IL-6-vermittelte Unterdrückung von T_{reg}-Zellen (Pasare 2003) kann zur vermehrten Bildung von selbst-reaktiven T-Zellen führen und zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis beitragen, denn IL-6^{-/-}-Mäuse sind gegen diese Art von Erkrankungen resistent (Ohshima 1998). Ein besseres Verständnis dieser Vorgänge kann zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze führen, mit dem Ziel, die Infiltration und Funktion von PDCs in entzündeten Gelenken über die Inhibition spezieller Interleukine zu blockieren.

Die Verbindung zwischen IFN- α und systemischem Lupus erythematoses (SLE) erfolgte zunächst an zwei klinischen Beobachtungen: Eine 23-jährige Patientin mit einem metastasiertem Karzinom entwickelte während einer IFN- α -Therapie einen SLE (Ronnblom 1990). Außerdem hatten vielen SLE-Patienten erhöhte Typ1-IFN-Konzentrationen im Serum (Preble 1982). Während die Zahl der im Blut zirkulierenden PDCs reduziert ist, akkumulieren aktivierte PDCs in Hautläsionen und produzieren Typ1-IFN. Diese PDCs scheinen von doppelsträngiger DNA in Immunkomplexen und in DNA aus apoptotischen Zellen aktiviert zu werden. Die Expression IFN-regulierter Gene repräsentiert das hervorstechendste molekulare Merkmal von peripheren Zellen im Blut von SLE-Patienten (Baechler 2003). Typ1-IFN könnte daher eines der wichtigsten Effektormoleküle in der Pathologie

dieser Erkrankung sein und somit als Angriffspunkt für eine Behandlung genutzt werden.

Über Adenosin-Agonisten, die am A2a-Rezeptor reifer PDCs binden, kann eine Inhibition der Zytokinproduktion wie IFN- α , IL-6 und IL-12 erreicht und somit eine inadäquat hohe Zellaktivierung verhindert werden. Schnurr et al. wies auch für ATP und Agonisten einen inhibitorischen Effekt auf die IL-12-Produktion in MonoDCs nach (Schnurr 2005), wodurch eine überschießende T-Zell-Aktivierung begrenzt werden konnte. Es wäre somit denkbar, dass in Zukunft spezifische Adenosin-Agonisten über ihre Bindung am A2a-Rezeptor reifer PDCs als Antirheumatika zum Einsatz kommen. Auf diese Weise könnte sowohl die überschießende IFN- α -Produktion bei SLE als auch das durch IL-6 vermittelte Ungleichgewicht zwischen T_{reg}- und selbst-reaktiven T-Zellen reduziert und so das Fortschreiten eines SLE bzw. einer Rheumatoiden Erkrankung gemindert werden.

Trotz großer Bemühungen, das migratorische Verhalten der plasmazytoiden dendritischen Zelle besser zu verstehen und trotz einer Fülle neuer Erkenntnisse in den letzten Jahren, gibt es immer noch viele offene Fragen, die es gilt, in weiteren Experimenten zu lösen. Besonders die klinisch therapeutische Intervention steckt erst in den „Kinderschuhen“. Wie dargelegt, spielen PDCs bei verschiedensten Krankheitsbildern eine wichtige Rolle. Der Transfer aktivierter PDCs bzw. die PDC-Depletion in diversen Modellen wird das Verständnis für die Funktion dieser Zellpopulation in der Pathologie vieler Krankheiten erweitern und klären müssen, ob und in welcher Situation die PDC eine geeignete Zielzelle für therapeutische Interventionen darstellt.

E Zusammenfassung

Plasmazytoide dendritische Zellen (PDCs) bilden eine Untergruppe dendritischer Zellen und sind durch ihre Fähigkeit zur Erkennung viraler Nukleinsäuren über die Mustererkennungsrezeptoren TLR9 und TLR7 sowie durch ihre Fähigkeit zur Produktion großer Mengen an Interferon gekennzeichnet. PDCs sind aufgrund ihrer Bedeutung bei der Abwehr viraler Infektionen und der Wirkungsvermittlung synthetischer Agonisten von TLR9 (CpG-ODN) und TLR7, die bereits in klinischen Studien als Immunmodulatoren eingesetzt werden, in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses gerückt.

Dendritische Zellen (DC) zählen zu den Antigen-präsentierenden Zellen und vermitteln zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Die Erkennung von exogenen und endogenen Gefahrensignalen am Ort einer Infektion oder eines Zellschadens führt über Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems zur Aktivierung und Ausreifung. Je nach Gefahrensignal und Art der dendritischen Zelle wird die Produktion unterschiedlicher kostimulatorischer Moleküle, Zytokine und Chemokine induziert; über die Interaktion mit T- und B-Zellen kommt es zu einer der jeweils auslösenden Situation angepassten Antwort des adaptiven Immunsystems. Das Auffinden der Gefahrenstelle und die Interaktion von DCs mit anderen Zellen des Immunsystems am richtigen Ort erfordert eine genau koordinierte Steuerung der Migration von DCs und von ihren Interaktionspartnern durch Chemokine und durch andere chemotaktisch aktive Substanzen. Diese chemotaktische Steuerung ist für PDCs bisher nur unzureichend verstanden. Während die Aktivierung von PDCs durch exogene Gefahrensignale, insbesondere durch CpG-Oligonukleotide via TLR9, bereits gut beschrieben ist, gibt es nur geringe Kenntnisse über die Wirkung endogener Gefahrensignale auf PDCs. Adenosin wird vor allem bei Entzündung oder Ischämie aus geschädigten Zellen freigesetzt und fungiert als interzelluläres Signalmolekül und endogenes Gefahrensignal. Zusätzlich zeigt es chemotaktische Aktivität und funktionsmodulierende Effekte auf andere Zelltypen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die weitere Charakterisierung sowohl der chemotaktischen Stimuli, auf die PDCs selbst reagieren, als auch derjenigen, die von CpG-stimulierten PDCs produziert werden. Zudem wurde versucht, Zielzellen zu identifizieren, die durch eben diese chemotaktischen Stimuli zum Wanderungsverhalten zu und damit zur Interaktion mit PDCs angeregt werden. Neben dem exogenen Gefahrensignal CpG-ODN wurde dabei auch die Wirkung des endogenen

Gefahrensignals Adenosin auf die Chemotaxis und die Zytokinproduktion von PDCs untersucht.

Die dargelegten Ergebnisse zeigen, dass PDCs nach Stimulation mit CpG-ODN die Chemokine IP-10, MIP-1 α und Rantes produzieren, während in unstimulierten PDCs keine inflammatorischen Chemokine nachweisbar sind. In Korrelation zum Kalziumflux in PDCs nach Stimulation mit SDF-1 stellt dieses homöostatische Chemokin in Migrationsassays den stärksten Lockstoff unter den Chemokinen dar. Obwohl die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 auf PDCs exprimiert werden, bewirken Liganden für diese Rezeptoren *per se* keine Migration. Die CXCR3-Liganden MIG und IP-10 sowie der CCR5-Ligand Rantes steigern jedoch in Kombination mit SDF-1 synergistisch die Migration von PDCs.

Nach Stimulation mit CpG-ODN locken PDCs über die von ihnen produzierten chemotaktischen Stoffe insbesondere weitere PDCs, sowie naive CD4-positive T-Zellen an, nicht jedoch Monozyten, B-Zellen oder CD8-positive T-Zellen.

PDCs exprimieren Adenosinrezeptoren. Das Muster der exprimierten Rezeptorsubtypen ist jedoch wie das Expressionsmuster für Chemokinrezeptoren vom Reifegrad der PDC abhängig. Unreife, nicht stimulierte PDCs exprimieren mRNA für den A₁-, nicht jedoch für den A₂- oder A₃-Rezeptor. Die Ausreifung der PDC führt zu einer verminderten mRNA-Transkription des A₁-Rezeptors und einer Hochregulation des A_{2a}-Rezeptors. Funktionelle Experimente zeigen, dass Adenosin - vermittelt über den A₁-Rezeptor - einen hochpotenten chemotaktischen Stimulus für unreife PDCs darstellt. Auf aktivierten PDCs verliert Adenosin wegen der verminderten A₁-Rezeptorexpression seine chemotaktische Aktivität, ist jedoch über den A_{2a}-Rezeptor in der Lage, die CpG-ODN induzierte Zytokinproduktion vor allem von IFN- α , aber auch von IL-6 und IL-12 signifikant zu vermindern.

Während der experimentellen Phase dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse zur Wirkung von CpG-DNA und Adenosin auf die Migration und Funktion von PDCs sowie zu dem fein abgestimmten Netzwerk der Chemokine gewonnen: Die Synergie zwischen homöostatischen und inflammatorischen Chemokinen reflektiert einen Sensibilisierungseffekt, der die PDC-Rekrutierung während entzündlicher Prozesse wie bei einer Virusinfektion kontrolliert. Oligonukleotide induzieren die Ausreifung und Aktivierung von PDCs und regen in diesem Zustand über die gesteigerte Zytokinsekretion von IFN- α und TNF- α eine stärkere Chemokinproduktion an. Die vermehrt produzierten Chemokine wie IP-10, MIP-1 α und Rantes tragen zusammen mit SDF-1 und weiteren Faktoren wie Adenosin zu einer gesteigerten Migration in entzündetes Gewebe bei. CpG-Oligonukleotide - obwohl selbst nicht chemotaktisch

aktiv - regen die PDC zur Sekretion eines „Stimulationscocktails“ an, worüber weitere PDCs und T-Zellen angelockt werden.

Für Adenosin lässt sich in Bezug auf die Funktion der PDC eine duale Rolle postulieren, indem es unreife PDCs über den A_1 -Rezeptor an den „Ort des Geschehens“ rekrutiert, zugleich aber eine inadäquat hohe oder chronische Zellaktivierung verhindert. Dies erfolgt über einen Rezeptorwechsel zum A_{2a} -Rezeptor, der einen anti-inflammatorischen Effekt über eine verminderte Zytokinproduktion von IFN- α , IL-6 und IL-12 vermittelt.

Die gewonnenen Erkenntnisse tragen zur Charakterisierung der plasmazytoiden dendritischen Zelle bei, die als Schaltzelle eine Vielzahl von Stimuli integriert und über die Interaktion mit zahlreichen anderen Zellpopulationen das Ausmaß einer Immunreaktion moduliert. PDCs und das von ihnen gebildete Typ1-Interferon spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, viralen Infektionen und Tumor-Erkrankungen. Für die kommenden Jahre bleibt die Herausforderung, die Hemmung oder Aktivierung der PDC-Funktion und -Migration im klinischen Alltag zur erfolgreichen Behandlung von Patienten umzusetzen.

F Literaturverzeichnis

Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 1994; 64(3):445-75

Agnello D, Lankford CS, Bream J, et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 2003; 23(3):147-61

Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, et al. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 2002; 32(7):1958-68

Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:787-820

An H, Yu Y, Zhang M, et al. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* 2002; 106(1):38-45

Anitescu M, Chace JH, Tuetken R, et al. Interleukin-10 functions in vitro and in vivo to inhibit bacterial DNA-induced secretion of interleukin-12. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17(12):781-8

Anthony DD, Yonkers NL, Post AB, et al. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol* 2004; 172(8):4907-16

Asselin-Paturel C, Brizard G, Chemin K, et al. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med* 2005; 201(7):1157-67

Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(5):2610-5

Ballas ZK, Krieg AM, Warren T, et al. Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J Immunol* 2001; 167(9):4878-86

Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 1996; 157(5):1840-5

Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811

Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, MaWhinney S, Wilson CC. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 2003; 187(1):26-37

Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270:81-92

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(16):9237-42

- Bazan JF**, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997; 385(6617):640-4
- Bendriss-Vermare N**, Burg S, Kanzler H, et al. Virus overrides the propensity of human CD40L-activated plasmacytoid dendritic cells to produce Th2 mediators through synergistic induction of IFN- γ and Th1 chemokine production. *J Leukoc Biol* 2005; 78(4):954-66
- Berne RM**. Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 1963; 204:317-22
- Blackwell SE**, Krieg AM. CpG-A-induced monocyte IFN- γ -inducible protein-10 production is regulated by plasmacytoid dendritic cell-derived IFN- α . *J Immunol* 2003; 170(8):4061-8
- Blom B**, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. Generation of interferon α -producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000; 192(12):1785-96
- Caux C**, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994; 180:1263-72
- Cella M**, Jarrossay D, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; 5(8):919-23
- Cella M**, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, et al. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184(2):747-52
- Chaplin DD**. 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2 Suppl Mini-Primer):S430-5
- Chehimi J**, Campbell DE, Azzoni L, et al. Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol* 2002; 168(9):4796-801
- Coccia EM**, Severa M, Giacomini E, et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004; 34(3):796-805
- Coley WB**. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893; *Clin Orthop Relat Res* 1991(262):3-11 (*classic collection*)
- Colonna M**, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004; 5(12):1219-26
- Cooper MA**, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* 2004; 25(1):47-52
- Coutinho-Silva R**, Persechini PM, Bisaggio RD, et al. P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *Am J Physiol* 1999; 276(5 Pt 1):C1139-47
- Creagh EM**, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* 2006; 27(8):352-7

- Cronstein BN.** Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 1994; 76(1):5-13
- Dalod M,** Hamilton T, Salomon R, et al. Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J Exp Med* 2003; 197(7):885-98
- Dalod M,** Salazar-Mather TP, Malmgaard L, et al. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* 2002; 195(4):517-28
- Davis HL,** Weeratna R, Waldschmidt TJ, et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 1998; 160(2):870-6.
- Di Virgilio F,** Chiozzi P, Ferrari D, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97(3):587-600
- Diacovo TG,** Blasius AL, Mak TW, et al. Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes. *J Exp Med* 2005; 202(5):687-96
- Dhodapkar MV,** Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193(2):233-8.
- Drury AN** and Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol (Lond)* 1929; 68:213-237
- Duramad O,** Fearon KL, et al. IL-10 regulates plasmacytoid dendritic cell response to CpG-containing immunostimulatory sequences. *Blood* 2003; 102(13):4487-92
- Facchetti F,** de Wolf-Peeters C, Mason DY, et al. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol* 1988; 133(1):15-21
- Feller AC,** Lennert K, Stein H, Bruhn HD, Wuthe HH. Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases. *Histopathology* 1983; 7(6):825-39
- Fitzgerald-Bocarsly P.** Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol Ther* 1993; 60(1):39-62
- Fong L,** Mengozzi M, Abbey NW, Herndier BG, Engleman EG. Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation. *J Virol* 2002; 76(21):11033-41
- Fonteneau JF,** Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Münz C, Liu YJ, Bhardwaj N. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2003;101(9):3520-6

- Fonteneau JF**, Larsson M, Beignon AS, et al. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* 2004; 78(10):5223-32
- Fossetta J**, Jackson J, Deno G, et al. Pharmacological analysis of calcium responses mediated by the human A3 adenosine receptor in monocyte-derived dendritic cells and recombinant cells. *Mol Pharmacol* 2003; 63(2):342-50
- Fraser IP**, Koziel H, Ezekowitz RA. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 1998; 10(5):363-72
- Fredholm BB**, Abbracchio MP, Burnstock G, et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 1994; 46(2):143-56
- Fredholm BB**, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53(4):527-52
- Fritz JH**, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 2006; 7(12):1250-7
- Gallucci S**, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001; 13(1):114-9
- Gautier G**, Humbert M, Deauvieu F, et al. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* 2005; 201(9):1435-46
- Gerlach E**, Deuticke B, Dreisbach RH, Rosarius CW. [on the Behavior of Nucleotides and Their Dephosphorylation Degradation Products in the Kidney in Ischemia and Short-Term Post-Ischemic Re-Establishment of Blood Circulation.]. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1963; 278:296-315
- Gerosa F**, Baldani-Guerra B, Nisii C, et al. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195(3):327-33
- Gilliet M**, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195(6):695-704
- Grouard G**, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997; 185(6):1101-11
- Hacker H**, Mischak H, Miethke T, et al. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 1998; 17(21):6230-40

- Hacker H**, Vabulas RM, Takeuchi O, et al. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* 2000; 192(4):595-600
- Hajjar AM**, O'Mahony DS, Ozinsky A, et al. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 2001; 166(1):15-9
- Hajjar AM**, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol* 2002; 3(4):354-9
- Hartmann E**, Wollenberg B, Rothenfusser S, et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 2003; 63(19):6478-87
- Hartmann G**, Battiany J, Poeck H, et al. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33(6):1633-41
- Hartmann G**, Weeratna RD, Ballas ZK, et al. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000; 164(3):1617-24
- Hashimoto C**, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52(2):269-79
- Hasko G**, Kuhel DG, Chen JF, et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *Faseb J* 2000; 14(13):2065-74
- Hayashi T**, Beck L, Rossetto C, et al. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2004; 114(2):270-9
- Hemmi H**, Kaisho T, Takeuchi O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3(2):196-200
- Hemmi H**, Kaisho T, Takeda K, Akira S. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol* 2003; 170(6):3059-64
- Hemmi H**, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408(6813):740-5
- Honda K**, Ohba Y, Yanai H, et al. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 2005; 434(7036):1035-40
- Hornung V**, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168(9):4531-7

- Illem A**, Mariani M, Lang R, et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2001; 194(6):847-53
- Ishii KJ**, Ito S, Tamura T, et al. CpG-activated Thy1.2+ dendritic cells protect against lethal *Listeria monocytogenes* infection. *Eur J Immunol* 2005; 35(8):2397-405
- Ito T**, Amakawa R, Inaba M, et al. Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol* 2004; 172(7):4253-9
- Ito S**, Ishii KJ, Shirota H, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides improve the survival of pregnant and fetal mice following *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 2004; 72(6):3543-8
- Janeway CA**. Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag* 2002
- Janeway CA Jr**, Medzhit. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216
- Jego G**, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003; 19(2):225-34
- Jose PJ**, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, et al. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med* 1994; 179(3):881-7
- Kadowaki N**, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2000; 192(2):219-26
- Kadowaki N**, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194(6):863-9
- Kaisho T**, Akira S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol* 2001; 22(2):78-83
- Kalinski P**, Smits HH, Schuitemaker JH, et al. IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J Immunol* 2000; 165(4):1877-81
- Karpus WJ**, Kennedy KJ. MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. *J Leukoc Biol* 1997; 62(5):681-7
- Kawai T**, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11(1):115-22
- Kerkmann M**, Costa LT, Richter C, et al. Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. *J Biol Chem* 2005; 280(9):8086-93

- Kerkmann M**, Rothenfusser S, Hornung V, et al. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170(9):4465-74
- Kim CH**. The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond. *Curr Opin Hematol* 2005; 12(4):298-304
- Klinman DM**, Conover J, Coban C. Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection. *Infect Immun* 1999; 67(11):5658-63
- Klinman DM**, Gursel I, Klaschik S, Dong L, Currie D, Shirota H. Therapeutic potential of oligonucleotides expressing immunosuppressive TTAGGG motifs. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1058:87-95
- Klinman DM**, Ishii KJ, Gursel M, et al. Immunotherapeutic applications of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Drug News Perspect* 2000; 13(5):289-96
- Klinman DM**, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(7):2879-83
- Krieg AM**. Now I know my CpGs. *Trends Microbiol* 2001; 9(6):249-52.
- Krieg AM**. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:709-60
- Krieg AM**, Love-Homan L, Yi AK, Harty JT. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* 1998; 161(5):2428-34
- Krieg AM**, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374(6522):546-9
- Krug A**, French AR, Barchet W, et al. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 2004; 21(1):107-19
- Krug A**, Rothenfusser S, Hornung V, et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001a; 31(7):2154-63
- Krug A**, Rothenfusser S, Selinger S, et al. CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells. *J Immunol* 2003; 170(7):3468-77
- Krug A**, Towarowski A, Britsch S, et al. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001b; 31(10):3026-37

- Krug A**, Uppaluri R, Facchetti F, et al. IFN-producing cells respond to CXCR3 ligands in the presence of CXCL12 and secrete inflammatory chemokines upon activation. *J Immunol* 2002; 169(11):6079-83
- Lande R**, Giacomini E, Grassi T, et al. IFN-alpha beta released by Mycobacterium tuberculosis-infected human dendritic cells induces the expression of CXCL10: selective recruitment of NK and activated T cells. *J Immunol* 2003; 170(3):1174-82.
- Lande R**, Giacomini E, Serafini B, et al. Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. *J Immunol* 2004; 173(4):2815-24
- Langenkamp A**, Nagata K, Murphy K, et al. Kinetics and expression patterns of chemokine receptors in human CD4+ T lymphocytes primed by myeloid or plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33(2):474-82
- Latz E**, Schoenemeyer A, Visintin A, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; 5(2):190-8
- Lazarowski ER**, Homolya L, Boucher RC, Harden TK. Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation. *J Biol Chem* 1997; 272(39):24348-54
- Lemaitre B**, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 1996; 86(6):973-83
- Lennert K**, Remmele W. [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinalblasts, lymphoblasts & lymphocytes.]. *Acta Haematol* 1958; 19(2):99-113
- Levy JA**, Scott I, Mackewicz C. Protection from HIV/AIDS: the importance of innate immunity. *Clin Immunol* 2003; 108(3):167-74
- Link AA**, Kino T, Worth JA, et al. Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol* 2000; 164(1):436-42
- Liu YJ**. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:275-306
- Lonsdorf AS**, Kuekrek H, Stern BV, Boehm BO, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. Intratumor CpG-oligodeoxynucleotide injection induces protective antitumor T cell immunity. *J Immunol* 2003; 171(8):3941-6
- Lusso P**. HIV and the chemokine system: 10 years later. *EMBO J* 2006 F;25(3):447-56
- Lyons AS**, Petrucelli II RJ. Die Geschichte der Medizin im Spiegel der Kunst. *DuMont Literatur und Kunst Verlag* 2003
- Mandeville JT**, Maxfield FR. Effects of buffering intracellular free calcium on neutrophil migration through three-dimensional matrices. *J Cell Physiol* 1997; 171(2):168-78

- Manzel L**, Macfarlane DE. Lack of immune stimulation by immobilized CpG-oligodeoxynucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1999; 9(5):459-64
- Matzinger P**. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:991- 1045
- Medzhitov R**, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000; 173:89-97
- Medzhitov R**, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9(1):4-9
- Megjugorac NJ**, Young HA, Amrute SB, Olshalsky SL, Fitzgerald-Bocarsly P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J Leukoc Biol* 2004; 75(3):504-14
- Mellor AL**, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(10):762-74
- Moldoveanu Z**, Love-Homan L, Huang WQ, Krieg AM. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine* 1998; 16(11-12):1216-24
- Montoya M**, Schiavoni G, Mattei F, et al. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* 2002; 99(9):3263-71
- Moseman EA**, Liang X, Dawson AJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 173(7):4433-42
- Moser B**, Chemokines: role in immune cell traffic. *Eur Cytokine Netw* 2003; 14(4):204-10
- Moser B**, Willmann K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 Suppl 2:ii84-ii89
- Munn DH**, Sharma MD, Hou D, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 2004; 114(2):280-90
- Mutini C**, Falzoni S, Ferrari D, et al. Mouse dendritic cells express the P2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation. *J Immunol* 1999; 163(4):1958-65
- Ngo VN**, Tang HL, Cyster JG. Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J Exp Med* 1998; 188(1):181-91
- Novak EJ** and Rabinovitch PS. Improved sensitivity in flow cytometric intracellular ionized calcium measurement using fluo-3/Fura Red fluorescence ratios. *Cytometry* 1994; 17(2): 135-41
- O'Doherty U**, Peng M, Gezelter S, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; 82(3):487-93

- O'Garra A**, McEvoy LM, Zlotnik A. T-cell subsets: chemokine receptors guide the way. *Curr Biol* 1998; 8(18):R646-9
- Ohta A**, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414(6866):916-20
- Olweus J**, BitMansour A, Warnke R, et al. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(23):12551-6
- Ohshima S**, Saeki Y, Mima T, et al. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(14):8222-6
- Oshiumi H**, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003; 4(2):161-7
- Palamara F**, Meindl S, Holcman M, Luhers P, Stingl G, Sibilio M. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J Immunol* 2004; 173(5):3051-61
- Panther E**, Corinti S, Idzko M, et al. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* 2003; 101(10):3985-90
- Panther E**, Idzko M, Herouy Y, et al. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *Faseb J* 2001; 15(11):1963-70
- Pasare C**, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; 299(5609):1033-6
- Pashenkov M**, Teleshova N, et al. Recruitment of dendritic cells to the cerebrospinal fluid in bacterial neuroinfections. *J Neuroimmunol* 2002; 122(1-2):106-16
- Pedata F**, Corsi C, Melani A, et al. Adenosine extracellular brain concentrations and role of A2A receptors in ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 939:74-84
- Peiser L**, Mukhopadhyay S. et al. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14(1): 123-8
- Penna G**, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: Selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2001; 167(4):1862-6
- Penna G**, Vulcano M, Roncari A, Facchetti F, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: Differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2002a; 169(12):6673-6
- Penna G**, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 2002b; 63(12):1164-71

- Pichyangkul S**, Endy TP, Kalayanarooj S, et al. A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is associated with increased disease severity. *J Immunol* 2003; 171(10):5571-8
- Pilon-Thomas S**, Li W, Briggs JJ, Djeu J, Mule JJ, Riker AI. Immunostimulatory effects of CpG-ODN upon dendritic cell-based immunotherapy in a murine melanoma model. *J Immunother* 2006; 29(4):381-7
- Poeck H**, Wagner M, Battiany J, et al. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* 2004; 103(8):3058-64
- Poltorak A**, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282(5396):2085-8
- Preble OT**, Black RJ, Friedman RM, Klippel JH, Vilcek J. Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science* 1982; 216(4544):429-31
- Proietto AI**, O'Keeffe M, Gartlan K, et al. Differential production of inflammatory chemokines by murine dendritic cell subsets. *Immunobiology* 2004; 209(1-2):163-72
- Ralevic V**, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50(3):413-92
- Rankin R**, Pontarollo R, Ioannou X, et al. CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2001; 11(5):333-40
- Renshaw M**, Rockwell J, Engleman C, et al. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol* 2002; 169(9):4697-701
- Rissoan MC**, Soumelis V, Kadowaki N, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283(5405):1183-6
- Ronnblom LE**, Alm GV, Oberg KE. Possible induction of systemic lupus erythematosus by interferon-alpha treatment in a patient with a malignant carcinoid tumour. *J Intern Med* 1990; 227(3):207-10
- Rose FR**, Hirschhorn R, Weissmann G, Cronstein BN. Adenosine promotes neutrophil chemotaxis. *J Exp Med* 1988; 167(3):1186-94
- Rossi D**, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:217-42
- Rothenfusser S**, Hornung V, Ayyoub M, et al. CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8+ T-cell responses in vitro. *Blood* 2004; 103(6):2162-9

- Rothenfusser S**, Tuma E, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum Immunol* 2002; 63(12):1111-9
- Rothenfusser S**, Tuma E, Wagner M, Endres S, Hartmann G. Recent advances in immunostimulatory CpG oligonucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 2003; 5(2):98-106
- Salio M**, Cella M, Vermi W, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur J Immunol* 2003; 33(4):1052-62
- Salio M**, Palmowski MJ, Atzberger A, Hermans IF, Cerundolo V. CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J Exp Med* 2004;199(4):567-79
- Sallusto F**, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 2000; 177:134-40
- Sallusto F**, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187(6):875-83
- Sallusto F**, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; 182(2):389-400
- Santeliz JV**, Van Nest G, Traquina P, Larsen E, Wills-Karp M. Amb a 1-linked CpG oligodeoxynucleotides reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109(3):455-62
- Schmidt B**, Ashlock BM, Foster H, Fujimura SH, Levy JA. HIV-infected cells are major inducers of plasmacytoid dendritic cell interferon production, maturation, and migration. *Virology* 2005; 343(2):256-66
- Schnurr M**, Toy T, Shin A, et al. Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2004; 103(4):1391-7
- Schnurr M**, Toy T, Shin A, et al. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood* 2005; 105(4):1582-9
- Schuerwegh AJ**, Stevens WJ, Bridts CH, De Clerck LS. Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Cytometry* 2001; 46(3):172-6
- Siegal FP**, Fitzgerald-Bocarsly P, Holland BK, Shodell M. Interferon-alpha generation and immune reconstitution during antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection. *Aids* 2001; 15(13):1603-12
- Siegal FP**, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284(5421):1835-7

- Siren J**, Pirhonen J, et al. IFN-alpha regulates TLR-dependent gene expression of IFN-alpha, IFN-beta, IL-28, and IL-29. *J Immunol* 2005; 174(4):1932-7
- Spits H**, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uittenbogaart CH. Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med*. 2000; 192(12):1775-84
- Stahl PD**, Ezekowitz RA. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(1):50-5
- Stein CA**, Subasinghe C, Shinozuka K, Cohen JS. Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(8):3209-21
- Steinman RM**, Mellman I. Immunotherapy: bewitched, bothered, and bewildered no more. *Science* 2004; 305(5681):197-200
- Takeda K**, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:335-76.
- Takeshita F**, Leifer CA, Gursel I, et al. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol* 2001; 167(7):3555-8
- Takeuchi O**, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* 2000; 12(1):113-7
- Thelen M**. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001; 2(2):129-34
- Tokunaga T**, Yamamoto H, Shimada S, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72(4):955-62
- Toth M**, Endresz V, et al. Human interferons alpha and beta have more potent priming activities than interferon gamma. *J Gen Virol* 1985; 66(4):893-6
- Treilleux I**, Blay JY, Bendriss-Vermare N, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(22):7466-74
- Van Belle H**, Goossens F, Wynants J. Formation and release of purine catabolites during hypoperfusion, anoxia, and ischemia. *Am J Physiol* 1987; 252(5 Pt 2):H886-93
- Vanbervliet B**, Bendriss-Vermare N, Massacrier C, et al. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med* 2003; 198(5):823-30
- Vermi W**, Riboldi E, Wittamer V, et al. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med* 2005; 201(4):509-15
- Verthelyi D**, Gursel M, et al. CpG oligodeoxynucleotides protect normal and SIV-infected macaques from *Leishmania* infection. *J Immunol* 2003; 170(9):4717-23

- Visintin A**, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166(1):249-55.
- Wagner M**, Poeck H, Jahrsdoerfer B, et al. IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA. *J Immunol* 2004; 172(2):954-63
- Weiner GJ**, Liu HM, Wooldridge JE, Dahle CE, Krieg AM. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(20):10833-7
- Wingender G**, Garbi N, Schumak B, et al. Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur J Immunol* 2006; 36(1):12-20
- Wittamer V**, Franssen JD, Vulcano M, et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med* 2003; 198(7):977-85
- Wollenberg A**, Wagner M, Gunther S, et al. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 2002; 119(5):1096-102
- Wooldridge JE**, Ballas Z, Krieg AM, Weiner GJ. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* 1997; 89(8):2994-8
- Yamamoto M**, Sato S, Hemmi H, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002; 420(6913):324-9
- Yao GQ**, Corrias S, Cheng YC. Identification of two oligodeoxyribonucleotide binding proteins on plasma membranes of human cell lines. *Biochem Pharmacol* 1996; 51(4):431-6
- Yi AK**, Tuetken R, Redford T, et al. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol* 1998; 160(10):4755-61
- Yoneyama H**, Matsuno K, Zhang Y, et al. Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* 2004; 16(7):915-28
- Yoneyama H**, Narumi S, Zhang Y, et al. Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes. *J Exp Med* 2002; 195(10):1257-66
- Yu Y**, Hagihara M, Ando K, et al. Enhancement of human cord blood CD34+ cell-derived NK cell cytotoxicity by dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166(3):1590-600
- Zabel BA**, Silverio AM, Butcher EC. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *J Immunol* 2005; 174(1):244-51

Zarembner KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002; 168(2):554-61

Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, et al. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 1998; 160(8):3627-30

Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001; 7(12):1339-46

G Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CFSE	5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CLA	<i>Cutaneous lymphocyte antigen</i>
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
CXCL	CXC-Chemokin-Ligand
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
Cys	Cystein
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HCV	Hepatitis C-Virus
HEV	Hoch-endotheliale Venolen
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen DR</i> (= MHC-II)
HS	Humanes Serumalbumin
HSP	Hitze-Schock-Protein
HSV	Herpes simplex-Virus
IDO	Indoleamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IKK	Inhibitor der NF- κ B-Kinase
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IP-10	<i>IFN-γ-inducible protein of 10kDa</i>
IPC	Interferon-produzierende Zelle
I-TAC	<i>IFN-inducible T cell α chemoattractant</i>
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leuzin-reiche Domäne
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MDC	<i>Monocyte-derived chemokine</i>
MIG	<i>Monocyte IFN-γ-inducible protein</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage-inflammatory protein 1 α</i>
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MYD 88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NF- κ B	Nuklearfaktor κ B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ODN	Oligo(desoxy)nukleotid
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBMC	Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PRR	<i>Pattern-recognition-Rezeptor</i>
Rantes	<i>Regulated-upon-activation, normal T- cell expressed and secreted</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SDF-1	<i>Stromal-derived factor 1</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
SSC	<i>Sideward scatter</i>

TARC	<i>Thymus- and activation-regulated chemokine</i>
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β
Th-Zelle	T-Helferzelle
TIR	Toll/ IL-1-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
T _{reg} -Zelle	Regulatorische T-Zelle
UDP	Uridin-5'-Diphosphat
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
VEGF- β	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor β
ZNS	Zentrales Nervensystem

H Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Endres, der mir die Arbeit an diesem Thema ermöglichte und mich fachlich wie auch persönlich unterstützte. Die Möglichkeit, in einer solch engagierten wie freundschaftlichen Atmosphäre der Abteilung zu forschen, war ein enormer wissenschaftlicher und persönlicher Gewinn.

Ich bedanke mich auch sehr bei Herrn Prof. Dr. Gunther Hartmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft. Seine positive Einstellung und Begeisterungsfähigkeit für die wissenschaftliche Arbeit sowie immer neue Ideen haben mich immer wieder motiviert.

Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Simon Rothenfußer bedanken, der mich wohl wie kein anderer Tag ein Tag aus intensiv betreute und mir mit seinem ausgiebigen wissenschaftlichen Rat und viel Geduld zur Seite stand. Sein großes Engagement und Interesse, auch über die Laborarbeit hinaus, war in dieser Zeit von enormer Bedeutung.

Frau Rosemarie Kiefl gilt mein großer Dank für die Einarbeitung in methodische Techniken und ihre uneingeschränkte Hilfe bei allen kleineren und größeren Problemen. Ich danke allen Doktoranden aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie, die mich bereitwillig und tatkräftig unterstützten und für das offene, freundliche Arbeitsklima sorgten. Ohne sie hätte der ein oder andere Labortag bei weitem nicht so viel Spaß gemacht.

I Veröffentlichung

Schnurr, M., T. Toy, A. Shin, G. Hartmann, S. Rothenfusser, **J. Soellner**, I. D. Davis, J. Gebon, E. Maraskovsky (2004). "Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells." Blood 103(4): 1391-7.

J Lebenslauf

Name **Julia Veronica Söllner**
Geburtsdatum/ -ort 16.04.1980 in Bamberg

Schulbildung

1986-1990 Besuch der Grundschule in Bamberg
1990-1999 Besuch des Kaiser-Heinrich-Gymnasiums in Bamberg
Juni 1999 Abitur

Hochschulbildung

1999-2006 Studium der Humanmedizin an der LMU in München
Sept. 2001 Physikum
Sept. 2002 I. Staatsexamen
WS 03/04 Auslandssemester in Cádiz, Spanien
März 2005 II. Staatsexamen
Mai 2006 III. Staatsexamen
Approbation als Ärztin

Stipendien

1999 – 2006 Bayerisches Begabtenstipendium
2003 – 2006 Stipendiatin des Cusanuswerks

Famulaturen

Sept. 2001 Innere Medizin im Klinikum Großhadern in München
März 2002 Notfallambulanz und Allgemeinmedizin im St.-Joseph's-Hospital in Elliot Lake, Kanada
März 2004 Gynäkologie im Hospital Puerta del Mar in Cádiz, Spanien
Aug. 2004 Anästhesie im Universitätsklinikum - Innenstadt, München

März 2003 Zweiwöchiger Psychatriekurs im Sanatorium Kilchberg, Zürich
Sept. 2004 Einwöchige Hospitanz in der neurologischen Nothilfe, Klinikum Großhadern

Praktisches Jahr

April – Juli 05 Innere Medizin, Medizinische Poliklinik - Innenstadt, München
Aug. – Nov. 05 Anästhesie, North York General Hospital, Toronto, Kanada
und Universitätsklinikum Innenstadt, München
Dez. – März 06 Chirurgie, Hospital del Mar, Barcelona, Spanien

Beruflicher Werdegang

seit Okt. 2006 Assistenzärztin an der Medizinischen Poliklinik der Universität München – Klinikum Innenstadt